

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Les propriétés mécaniques du réseau  
cellulose/xyloglucanes dans la croissance apicale du tube  
pollinique**

par

Leila Aouar

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître  
ès Sciences (M. Sc)

Août 2007

© Leila Aouar, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Les propriétés mécaniques du réseau  
cellulose/xyloglucane dans la croissance apicale du tube  
pollinique**

Présentée par :

Leila Aouar

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**David Morse**, président-rapporteur

**Anja Geitmann**, directeur de recherche

**Denis Barabé**, membre du jury

## Résumé

Les tubes polliniques sont des cellules à croissance rapide et apicale. Tout comme les poils racinaires et les hyphes fongiques, la croissance se limite à l'apex du tube où elle est soutenue par l'apport de vésicules et par la force dérivant de la pression hydrostatique. Les tubes offrent deux zones de géométries distinctes : une zone apicale oviforme et une distale cylindrique. La partie distale ne croît pas contrairement à la partie apicale qui est continuellement en expansion. La paroi cellulaire à l'apex est extensible et suffisamment résistante afin de permettre la croissance. La paroi distale quand à elle semble jouer un rôle dans la résistance au stress générée par la pression hydrostatique interne.

Mon projet de Maîtrise a porté sur la structure de la paroi de cette partie distale et sur son rôle dans la résistance à la pression interne et indirectement son impact sur la croissance apicale. Comme le réseau cellulose/xyloglucanes des parois primaires est connu pour être le réseau porte charge lors de la croissance diffuse, les deux composés analysés sont la cellulose et les xyloglucanes. La digestion de la cellulose induit la synthèse accrue de composants pectiques, ce qui permet le maintien d'une croissance normale. La cellulose cristalline joue un rôle crucial dans la résistance au stress dans la zone subapicale que nous qualifions de transition entre les zones apicale et distale. Le réseau jouerait un rôle de stabilisation en particulier dans cette zone, siège d'irrégularités et/ou de renflement. La cellulose, quoique peu présente dans la paroi pollinique distale, semble être indispensable à établir la résistance de la paroi à la pression interne.

### Mots-clés :

Croissance apicale, Paroi cellulaire, Pression hydrostatique, Réseau Cellulose/Xyloglucanes, Stress de tension, Zone Subapicale

## **Abstract**

Pollen tubes are extremely rapidly growing cells. Similar to root hairs and fungal hyphae, growth is confined exclusively to the tip of the tube and it is sustained by the continuous liberation of secretory vesicles delivering components for cell wall expansion. A pollen tube has two distinct zones, an apical extensible dome and a distal non growing cylindrical region. Internal hydrostatic pressure drives apical growth since the cell wall is sufficiently resistant to prevent rupture. While the apical cell wall shows high deformability, the distal cell wall plays an important role in resisting circumferential tension stress generated by the hydrostatic pressure.

My Master's project investigates the role of the distal cell wall in the apical growth of pollen tubes. The load-bearing system in the cell walls of diffusely growing cells is mainly composed of cellulose and xyloglucans; therefore, the mechanical role of this cellulose/xyloglucans network in apical growth was examined. Enzymatic digestion of cellulose resulted in increased levels of secreted pectic components in the pollen tube cell wall - probably a compensation mechanism - thus allowing the growth to occur normally. Moreover, crystalline cellulose was found to play a crucial role in resisting tension stress generated at the subapical zone, identified as a transitional zone between the apical dome and the distal cylinder. The cellulose/xyloglucans network seems important for stabilization of the cell wall at the subapical domain where irregular growth or/and swelling take place. Despite the fact that the abundance of cellulose is uncharacteristically low in the pollen tube cell wall (compared to other plant cells), it seems essential in contributing to the tensile resistance of the cell wall against the internal turgor pressure in this cell, in particular in its critical subapical region.

### **Keywords**

Apical growth, Cell wall, Cellulose/Xyloglucans, Hydrostatic pressure, Subapical domain, Tension stress

## Table des matières

Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	xvii
Remerciements .....	xix
 <i>Chapitre I : Introduction Générale</i> .....	1
1.1 La reproduction sexuée .....	1
1.2 Organe floral femelle et gamétogenèse .....	1
1.3 Organe floral mâle et gamétogenèse .....	2
1.4 La fécondation chez les angiospermes .....	3
1.5 La croissance au sein du monde végétal.....	4
1.5.1 La croissance apicale.....	5
1.5.2 Mécanisme de croissance cellulaire .....	7
1.5.2.1 Relation entre l'influx d'eau et les propriétés physiques de la paroi .....	7
1.5.2.2 Rôle du cytosquelette dans la croissance apicale .....	7
1.6 Structure de la paroi cellulaire végétale .....	8
1.6.1 L'ultrastructure de la paroi cellulaire des tubes polliniques .....	9
1.6.1.1 Les pectines .....	11
1.6.1.2 Le $\beta$ -1,3-glucan .....	12
1.6.1.3 La cellulose : synthèse, cristallisation et propriétés physico-chimiques .....	14
1.6.1.4 Les xyloglucanes: biosynthèse et structure .....	18
1.7 Le réseau cellulose-xyloglucanes .....	19
1.7.1 Formation du réseau : conditions d'assemblage.....	19
1.8 Mécanique de la croissance apicale:.....	20
1.8.1 Contraintes physiques.....	20
1.9 Objectifs et motivations.....	21
1.10 Approches et stratégies.....	22
1.11 Organisation du mémoire .....	23

<i>Chapitre II: Crystalline cellulose has the role of a transient stabilizer in the cell wall expansion zone of growing pollen tubes</i> .....	35
Abstract .....	35
2.1 Introduction .....	36
2.2 Materials and Methods .....	39
2.2.1 Plant material.....	39
2.2.2 Pollen culture.....	39
2.2.3 Brightfield observations .....	39
2.2.4 Fluorescence label .....	40
2.2.5 Fluorescence microscopy .....	40
2.2.6 Scanning Electron Microscopy .....	41
2.3 Results .....	42
2.3.1 The net orientation of cellulose microfibrils is not transverse .....	42
2.3.2 Cellulase affects pollen tube germination and growth differently in <i>Lilium</i> and <i>Solanum</i> .....	42
2.3.3 Cellulose is implicated in determining the pollen tube diameter .....	43
2.3.4 The effects of cellulase addition on pre-germinated pollen tubes.....	44
2.3.5 Cellulase treatment leads to an overproduction of other cell wall components..	45
2.3.6 Inhibition of cellulose crystal formation affects pollen tube cell wall mechanics .....	46
2.4 Figures .....	47
2.5 Discussion .....	56
2.5.1 Cellulose plays a role in pollen tube cell wall mechanics .....	56
2.5.2 Pollen tube sensibility to drugs and enzymes differs between <i>Lilium</i> and <i>Solanum</i> .....	56
2.5.3 Growing pollen tubes can compensate for the lack of cellulose with the production of pectin.....	58
2.5.4 Microfibril orientation and the mechanics of cellular growth.....	59

2.5.5 The pollen tube diameter is determined in the subapical region .....	60
2.6 Conclusions .....	62
2.7 References .....	64

*Chapitre III : Rôle du fucose des chaînes latérales des xyloglucanes dans la croissance des tubes polliniques* .....

3.1 Introduction .....	68
3.2 La biosynthèse et la distribution du fucose chez les plantes .....	71
3.3 Propriétés mécaniques du réseau - Rôle des chaînes latérales .....	72
3.4 Objectifs et Motivations .....	76
3.5 Matériels et Méthodes .....	77
3.5.1 Matériel végétal .....	77
3.5.2 Culture de pollen .....	77
3.5.3 Traitement enzymatique .....	77
3.5.4 Observations en champ clair .....	78
3.5.5 Microscopie à fluorescence .....	78
3.5.6 Microscopie électronique à transmission .....	78
3.6 Résultats .....	80
3.6.1 Immunomarquage des xyloglucanes en microscopie à fluorescence .....	80
3.6.2 Localisation des xyloglucanes en microscopie électronique à transmission .....	80
3.6.3 La croissance du tube pollinique est affectée par l'élimination du fucose .....	81
3.7 Discussion .....	86
3.8 Bibliographie .....	89



<i>Chapitre IV Discussion générale et conclusions</i> .....	93
4.1 Futures perspectives .....	102
4.1.1 Emploi de mutants pariétaux .....	102
4.1.2 Optimisation de l'immunomarquage pariétal .....	103
4.1.3 Emploi de la microscopie confocale.....	103
4.1.4. Caractérisation et localisation de la machine de synthèse de la cellulose .....	104
4.2 Bibliographie .....	105

## Liste des figures

### Chapitre I : Introduction générale

- Figure 1** Structure schématique d'une fleur d'angiosperme 1
- Figure 2** Accumulation des vésicules issues de l'appareil de Golgi à l'apex où elles subiront l'exocytose. Ceci permettra l'approvisionnement de la membrane et de la paroi en matériel nécessaire pour la croissance chez *Lilium longiflorum*. Barre = 1  $\mu\text{m}$  (Lancelle et al. 1992) 6
- Figure 3** Les trois zones d'expansion chez les poils racinaires de *Medicago truncatula* (Dumais et al. 2004) 6
- Figure 4** Structure générale d'une paroi cellulaire avec son réseau de polysaccharides. [www.micro.magnet.fsu.edu](http://www.micro.magnet.fsu.edu) 9
- Figure 5** Schématisation de la composition chimique de la paroi d'un tube pollinique d'angiosperme avec spécification des différentes zones le composant 10
- Figure 6** Chaîne principale d'acides polygaracturonique en zig-zag. <http://fr.wikipedia.org> 12
- Figure 7** L'association des ions de calcium aux pectines non-estérifiées. [www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr) 12
- Figure 8** Structure chimique de la callose. [www.biologie.uni-hamburg.de](http://www.biologie.uni-hamburg.de) 14

- Figure 9** Structure moléculaire de la cellulose. *www.lsbu.ac.uk* 17
- Figure 10** Un modèle hypothétique du complexe de synthèse de la cellulose (*Somerville 2006*) 17
- Figure 11** Micrographe d'immunomarquage d'une rosette chez une plante vasculaire *Vigna angularis* (*Kimura et al. 1999*). La tache noire à gauche correspond au grain d'or du marquage vu en microscopie électronique à transmission 17
- Figure 12** Structure d'un fragment de xyloglucanes montrant les xyloses ainsi que les résidus de galactose et de fucose. Les enzymes impliquées dans la synthèse du xyloglucanes paraissent en vert sur la figure. *www.prl.msu.edu/cellwallnet* 18
- Figure 13** Les trois zones de liaison entre les microfibrilles de cellulose et les chaînes de xyloglucanes au sein du réseau cellulose/xyloglucanes des parois primaires des plantes vasculaires 19

## Chapitre II

**Figure 1** Scanning electron micrographs of chemically fixed *Lilium orientalis* tubes treated with pectinase and lyticase. A shows the apex of an untreated control tube. B, C and D show the external layer of microfibrils and their helical orientation with a pitch of 25° to the longitudinal axis of growth. Bars = 8 µm (A and B), 4,5 µm (C and D) **47**

**Figure 2** Scanning electron micrographs of chemically fixed *Solanum chacoense* tubes treated with a combination of enzymatic digestions. Control pollen in A. Pectinase and lyticase digestion in B. C shows a pectinase treated tube where the putative layer of cellulose is partially exposed. Bar = 7 µm **48**

**Figure 3** Effect of cellulase on pollen tube length measured 2h after germination for *Lilium* and 4h for *Solanum* **49**

**Figure 4** Effect of cellulase on pollen tube diameter measured 2h after germination for *Lilium* and 4h for *Solanum* **49**

**Figure 5** Fluorescence label with monoclonal antibody JIM7 for methyl-esterified pectins in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase (A, B) or boiled enzyme (C) resulting in outgrowth in new direction (A, B). The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Bar = 25 µm **50**

**Figure 6** Fluorescence label with monoclonal antibody JIM5 for unesterified pectins in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase (A, B) or boiled enzyme (C) resulting in outgrowth in new direction (A, B). The

arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Bar = 30  $\mu\text{m}$  51

**Figure 7** Fluorescence label with calcofluor white for cellulose in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase resulting in a swelling and new outgrowth. The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Cellulose label decreases in tube portions grown after cellulase application (marked by black arrows). Bar = 35  $\mu\text{m}$  52

**Figure 8** Fluorescence label with aniline blue for callose in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase resulting in a swelling and new outgrowth. The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Callose label is very weak in the portions grown after enzyme addition. Bar = 30  $\mu\text{m}$  52

**Figure 9** Treatment of pre-germinated *Solanum chacoense* tubes with 1.5% cellulase. Arrows in DIC images indicate time point of treatment (A, C) Fluorescence label with calcofluor white of cellulose (B, D) is very weak in the newly formed portions of the tube. Bar = 16  $\mu\text{m}$  53

**Figure 10** Treatment of pre-germinated *Solanum chacoense* tubes with 1.5% cellulase. Arrows in DIC images indicate time point of treatment (A, C) Fluorescence label with JIM5 for acidic pectins (B,D) shows a normal labelling such as in control tubes. Bar = 16  $\mu\text{m}$  53

**Figure 11** Effect of CGA on the diameter of *Solanum chacoense* pollen tubes germinated in the presence of the agent 54

**Figure 12** Effect of CGA on the diameter of *Lilium orientalis* pollen tubes germinated in the presence of the agent **54**

**Figure 13** Phenotypes of pre-germinated *Lilium* tubes treated with 50 $\mu$ M CGA (A and B) and 100 $\mu$ M CGA (C and D). Arrows indicate the time of administration. Bar = 17  $\mu$ m **55**

## Chapitre III

**Figure 1** Les deux conformations possibles des xyloglucanes. *www.ccrc.uga.edu*. Les zones claires correspondraient aux chaînes latérales attachées à la chaîne de glucose en plus foncé. 70

**Figure 2** Le réseau de cellulose d'origine bactérienne en présence de xyloglucanes d'origine végétale vu en microscopie électronique à transmission (deep-etch freeze fracture) (*Whitney et al. 2006*) 75

**Figure 3** L'absence de connexion entre les fibrilles de cellulose bactérienne et les xyloglucanes ayant 35% depleted-galactose dans leurs chaînes latérales. À noter l'apparence isotropique de l'arrangement de ces fibrilles vues en microscopie électronique à transmission (deep-etch freeze fracture). (*Whitney et al. 2006*) 75

**Figure 4** Deux exemples du marquage des xyloglucanes avec le CCRC-M1 des tubes de *Solanum chacoense*. Les tubes, après 4h de croissance, montrent un marquage des parties distale et/ou apicale des tubes. Barre = 10 µm 82

**Figure 5** Le marquage des xyloglucanes avec le CCRC-M1 des tubes de *Lilium orientalis*. Les tubes, après 2h de croissance, montrent un marquage des parties distale et/ou apicale des tubes. En A, le cercle rouge délimite la partie apicale ne présentant pas de marquage du fucose. Barre = 17 µm 82

**Figure 6** Micrographes en microscopie électronique à transmission de coupes marquées pour xyloglucanes avec l'anticorps CCRC-M1 au niveau de la paroi du grain de pollen (A)

et tube pollinique (B) de *Solanum chacoense*. Aucun marquage n'est visible. Cy : cytoplasme, i : intine, n : nexine. Barre = 0.4  $\mu\text{m}$  (A et B) 83

**Figure 7** Micrographes du marquage des xyloglucanes avec l'anticorps CCRC-M1 au niveau de la paroi du grain de pollen (A) et la paroi d'un tube (B) de *Lilium orientalis*. PC= paroi cellulaire. Le marquage est associé à la paroi cellulaire. Barre = 0.25  $\mu\text{m}$  83

**Figure 8.** Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase (0.015 unités/mL) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. Les flèches marquent le moment auquel l'enzyme ayant causée le changement de direction de croissance dans A et B a été appliquée. À cette concentration de l'enzyme, ce changement de direction ne se s'accompagne pas de modifications de la morphologie apicale. Barre = 30  $\mu\text{m}$  84

**Figure 9.** Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase (0.045 unités/mL) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. On peut noter les modifications de la morphologie apicale qui renfle en A et en C. Le diamètre de la partie apicale augmente causant des formes bulbeuses en C, D et E. En B, on note la croissance du tube en spirale. Barre = 30  $\mu\text{m}$  84

**Figure 10.** Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase (0.060 unités/mL) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. Les flèches marquent le moment auquel l'enzyme ayant causée le changement de direction de croissance. Barre = 30  $\mu\text{m}$  85



## Chapitre IV : Discussion générale et conclusions

**Figure 1.** La zone subapicale est entourée d'une ellipse noire. À noter que les forces de tension en direction circonférentielle y sont deux fois plus importantes que celles agissant longitudinalement à l'apex entouré d'un cercle rouge. L'apex est continuellement approvisionné en pectines qui subissent tout au long de la croissance une dé-estérification et contribuent à rigidifier la partie distale des tubes

98

**Figure 2.** Les étapes proposées dans les tubes traités avec la cellulase. La première étape consiste en un changement de la composition chimique de la zone apicale. L'étape 2 survient suite à ce changement et se résume en un arrêt temporaire de la croissance, imposée par le manque d'élasticité de la paroi apicale. La troisième étape marque la reprise de la croissance toujours soutenue par la pression interne (flèche blanche) et le relâchement de la paroi subapicale suite à la digestion de la cellulose

100

## Liste des sigles et des abréviations

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> : Nitrate de calcium

cf : Conférer

ddH<sub>2</sub>O : Eau double distillée

DIC : Differential interference contrast

*et al:* *et alia*

EGTA: Acide éthylène Glycol-bis (β-aminoethylether)-N, N, N', N' –tétraacétique

Fig: Figure

GM: Growth Medium

h: Heure

H<sub>2</sub>O : Eau

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : Acide borique

IgG: Immunoglobuline G

$K_2HPO_4$ :	Phosphate de potassium
$KNO_3$ :	Nitrate de potassium
M :	Molaire
MES :	Acide 2-(4-Morpholino)-Éthane sulfonique
MET :	Microscopie électronique à transmission
$MgCl_2$ :	Chlorure de magnésium
$MgSO_4$ :	Sulfate de magnésium
min :	Minutes
PBS :	Phosphate buffered saline
Pipes :	Piperazine-N,N' –bis[2-ethanesulfonic acid]
UV:	Ultra violet

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Anja Geitmann pour son encadrement, sa confiance ainsi que ses précieux conseils. Je tiens à souligner également son support financier et sa grande patience sans lesquels ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour.

Je voudrais aussi remercier David Morse et Denis Barabé pour avoir été sur mon comité conseil ainsi que pour les efforts et l'attention qu'ils auront accordés à l'évaluation de ce mémoire.

Ma gratitude va vers Louise Pelletier pour avoir agréablement partagé ses connaissances en microscopie électronique et pour avoir adapté le support technique aux exigences imposées par certaines expériences.

Je remercie Davina Sumbal pour sa participation dans la réalisation des expériences du chapitre III, dans le cadre de son stage au sein du laboratoire

Je dois une pensée toute spéciale à mes trois garçons Guy, Léon et Rémy et à mes parents qui malgré les distances ont été pour moi une inépuisable source d'inspiration.

# ***Chapitre I : Introduction Générale***

## **1.1 La reproduction sexuée**

La reproduction est une condition imputable à la longévité des espèces. Quand elle est sexuée, la reproduction chez les plantes repose sur la fécondation des gamètes femelles par leurs partenaires mâles et par conséquent le développement de l'embryon. Chez les angiospermes, la fleur (Fig.1) est le site où se déroulent les différentes étapes de la reproduction sexuée. Débutant par la mise en place des gamètes, cette reproduction s'achève par la réalisation de la fécondation donnant naissance au zygote à partir duquel se développera l'embryon.

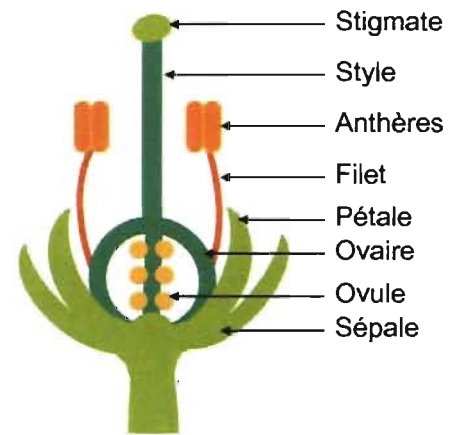


Figure.1. Structure schématique d'une fleur d'angiospermes

## **1.2 Organe floral femelle et gamétogenèse**

Le pistil ou organe femelle d'une fleur est le siège de formation des ovules comportant les sacs embryonnaires ou gamétophytes femelles. Il comprend un stigmate, lieu de réception des gamétophytes mâles ou grain de pollen. À maturité, un stigmate ne présentant pas de sécrétions est dit sec. Un stigmate sec est muni d'un épiderme papillé avec cuticule alors qu'un stigmate humide présente une couche plus ou moins continue de mucus à maturité (Heslop-Harrison *et al.* 1977; Hristova *et al.* 2005; Duarte *et al.* 2006).

Il se prolonge d'un style à la base duquel se trouve l'ovaire contenant les ovules. Un ovule comprend, en plus des tissus constitutifs, le sac embryonnaire. Stigmate et style peuvent être creux comme chez le lys ou solides comme chez *Arabidopsis* et *Solanum* avec un tissu transmissif central (Lennon *et al.* 1998). Stigmate et style permettent la réception, l'adhésion et le guidage du pollen compatible lors de sa quête d'ovules. Au sein des espèces auto-incompatibles, le stigmate et le style ont une fonction essentielle dans le mécanisme de l'incompatibilité sporophytique et gamétophytique respectivement.

Au sein d'un ovule, la cellule sporophytique ou cellule mère des mégaspoires subit une méiose, ce qui donne naissance à quatre cellules haploïdes ou mégaspoires. Trois de ces cellules subiront une mort programmée laissant ainsi une unique mégaspore fonctionnelle. Celle-ci subira trois mitoses donnant naissance au sac embryonnaire ou gamétophyte femelle. Dans la plupart des espèces des angiospermes ce dernier contient sept cellules: 2 synergides et l'oosphère, près du micropyle, 3 cellules antipodales, près de la chalaze, ainsi que une cellule centrale avec 2 noyaux polaires.

### 1.3 Organe floral mâle et gamétogenèse

Les étamines représentent l'organe mâle d'une fleur. Ils comportent deux parties distinctes : les filets et les anthères. Le filet supporte l'anthère, où logent les grains de pollen, tout en les rendant accessibles aux différents modes de pollinisation. La gamétogenèse mâle a lieu dans les sacs polliniques des anthères. Les gamètes mâles naissent à partir de microsporocytes qui après méiose donnent les tétrades de microspores. Les gamétophytes mâles ou grains de pollen sont mis en place par une première mitose qui donne naissance à deux cellules, une végétative et une autre générative. La première forme le grain de pollen, la deuxième est renfermée à l'intérieur. Le grain de pollen renferme ainsi deux noyaux haploïdes : le noyau végétatif plus gros que le noyau génératif ou reproducteur. Certaines espèces comme *Arabidopsis* ont un pollen tricellulaire du fait d'une deuxième division

mitotique de la cellule générative donnant naissance à deux cellules séminales. Cette division peut avoir lieu avant ou après la germination du grain de pollen.

## 1.4 La fécondation chez les angiospermes

La pollinisation est une phase préalable à la germination du pollen, à la croissance du tube pollinique et à la fécondation proprement dite. La pollinisation revêt une importance particulière, car en effet, elle peut se réaliser selon le mode d'auto-pollinisation ou bien la pollinisation croisée. Ceci détermine le niveau de brassage génétique dans une espèce.

La germination du pollen commence par un gonflement du grain par absorption d'eau à la surface du stigmate. Les vacuoles turgescentes poussent l'intine et le cytoplasme vers une ouverture du grain de pollen. Ensuite une protubérance est formée qui s'allonge pour former un tube. Le tube traverse le style sans jamais pénétrer dans les cellules avoisinantes. Guidé par des signaux chimiques et par la géométrie du pistil le tube retrouve son chemin et rentre par le micropyle de l'ovule.

La fécondation est un processus ne pouvant avoir lieu en l'absence de la germination du grain de pollen. De plus, la croissance du tube pollinique et la pénétration des structures florales sont indispensables à sa réalisation. Stigmate, style et sac embryonnaire assurent un rôle de guidance tant physique que chimique du tube pollinique lui permettant d'accomplir sa mission.

Après pénétration de l'ovule, le tube pollinique éclate et les deux cellules spermatiques sont propulsées dans le sac embryonnaire. Une double fécondation aura lieu donnant naissance au zygote principal ou embryon issu de la fusion d'un noyau spermatique avec celui de l'oosphère. Un zygote dit accessoire ou albumen est le résultat de la fusion du deuxième noyau spermatique avec les 2 noyaux centraux. L'albumen consiste en un tissu de réserve servant à assurer le développement de l'embryon.

La croissance cellulaire est pour le tube pollinique sa seule raison d'être. En fait sa croissance est indispensable à l'accomplissement de la fécondation et par conséquent au développement de fruits. En règle générale, la reproduction sexuée ne peut avoir lieu sans la croissance cellulaire appropriée du tube pollinique.

## 1.5 La croissance au sein du monde végétal

La croissance cellulaire est un aspect important de la différenciation. En plus de modeler la morphologie d'une plante, elle détermine sa taille. En vue de croître, les cellules végétales doivent inévitablement franchir l'obstacle physique que représente leur paroi primaire sans pour autant perturber son intégrité mécanique (Cosgrove 2001).

Dans son terme le plus large, le mode de croissance cellulaire le plus commun chez les plantes supérieures est qualifié de diffus. L'expansion affecte la surface totale ou en grande partie de la cellule. Quant à la direction de la croissance, elle est largement déterminée par les propriétés physiques locales de la paroi, sa déformabilité et son anisotropie. Les deux paramètres caractérisant la croissance anisotrope sont la direction du taux maximal d'expansion ainsi que le degré avec lequel ceci dépasse le taux minimal d'expansion (Baskin *et al.* 1999). L'axe du taux d'expansion maximale est perpendiculaire à l'alignement des microfibrilles (Green 1980; Taiz 1984). Par ailleurs, une réduction, voire une perte de l'anisotropie, accompagne l'inhibition de la synthèse de la cellulose chimiquement ou à travers la machine génétique (Hogetsu *et al.* 1974; Arioli *et al.* 1998). Cependant, la perte de l'anisotropie ne s'accompagne pas de la perte de l'orientation transversale des microfibrilles dans les cellules de racines de *mor1-1* (Wasteney *et al.* 2006). Ce mutant d'*Arabidopsis thaliana* génère des phénotypes sensibles à la température. À hautes températures, les microtubules se désorganisent ce qui se traduit par un renflement des cellules et des organes menant à l'arrêt de la croissance (Whittington *et al.* 2001).



La désorganisation des microtubules pourrait entraver la synthèse de longues microfibrilles possiblement essentielles à la réalisation de la croissance de façon anisotrope (Wasteneys *et al.* 2006). Contrairement au mode diffus, la croissance apicale est le mode de croissance propre aux hyphes fongiques caractérisant les champignons mycorhizens ainsi qu'aux structures végétales en particulier, les poils racinaires et les tubes polliniques. Elle se distingue du mode diffus par le fait qu'uniquement une partie très restreinte de la surface de la cellule est soumise à l'expansion.

### **1.5.1 La croissance apicale**

La croissance apicale assure aux cellules qu'elle caractérise une certaine mobilité (Lord 2000). Elle est caractéristique pour des cellules qui doivent envahir d'autres tissus comme les tubes polliniques et les hyphes fongiques ou leur environnement tel que les poils racinaires. Ces cellules sont caractérisées par une forme cylindrique allongée et un apex approximativement hémisphérique (Geitmann et Emons. 2000; Hepler *et al.* 2001). La différence principale avec la croissance diffuse est que la croissance a lieu sur une région très restreinte de la surface de la cellule.

L'élongation rapide et continue de ces cellules repose sur la livraison de nouveau matériel par exocytose à l'apex. Membrane plasmique et paroi cellulaire de la zone apicale sont mises en place continuellement par fusion vésiculaire. Ces vésicules sont transportées via les éléments du cytosquelette vers l'apex où elles s'accumulent. Étant donné leur petite taille, les vésicules ne sont pas visibles en microscopie optique; cette zone apicale apparaît claire dans les tubes polliniques d'où le nom "zone claire". Au microscope électronique à transmission on peut distinguer un grand nombre de vésicules sécrétrices destinées à fusionner à la zone apicale (Fig.2). À quelques microns de l'extrême apex, on trouve des organelles plus larges tels que appareil de Golgi, mitochondries et réticulum endoplasmique (Taylor *et al.* 1997; Geitmann et Emons 2000; Lennon *et al.* 2000).

L'élongation continue de la cellule augmente le volume total de celle-ci. Pour limiter la quantité de cytoplasme, la région apicale est séparée du reste de la cellule par des cloisonnements du tube formés par les bouchons de callose (Hepler *et al.* 2001). Durant la croissance, le cytoplasme ainsi que le noyau végétatif et la cellule générative (ou les deux cellules spermatiques) sont continuellement projetés vers l'avant. La paroi cellulaire quant à elle semble adhérer aux cellules environnantes du tissu transmissif et ne bouge pas par rapport à elles.

Figure.2. Accumulation des vésicules issues de l'appareil de Golgi à l'apex où elles subiront l'exocytose. Ceci permettra l'approvisionnement de la membrane et de la paroi en matériel nécessaire pour la croissance chez *Lilium longiflorum* vue en microscopie électronique à transmission. Barre = 1  $\mu\text{m}$  (Lancelle *et al.* 1992).

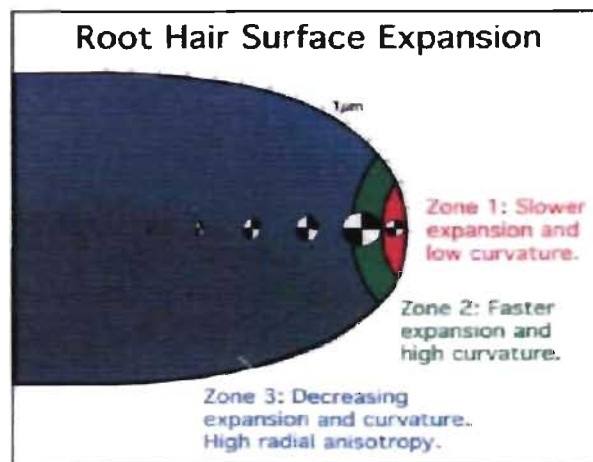
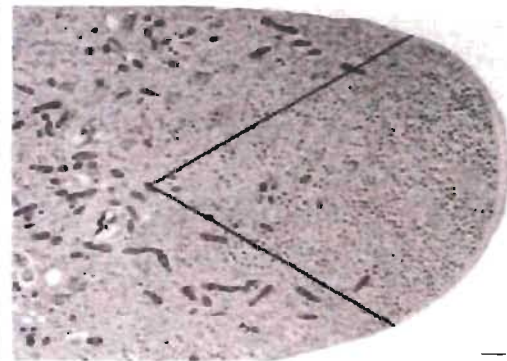


Figure.3. Les trois zones d'expansion chez les poils racinaires de *Medicago truncatula* (Dumais *et al.* 2004).

## **1.5.2 Mécanisme de croissance cellulaire**

### **1.5.2.1 Relation entre l'influx d'eau et les propriétés physiques de la paroi**

Tout au long de l'expansion cellulaire, la relation entre les propriétés physiques de la paroi ainsi que la pression cellulaire interne générée par l'influx d'eau est crucial (Cosgrove 1987). Ces deux processus sont interdépendants. En effet, une situation de stress-relaxation pariétal causée par une diminution de la pression interne et impliquant un influx d'eau sont les simples piliers stratégiques de la croissance (Cosgrove 2005). L'influx d'eau est responsable de l'expansion cellulaire. D'un point de vue mécanique, la paroi cellulaire consiste en deux sortes d'éléments. Les éléments élastiques qui sont capables de retrouver leur forme originale après la disparition de la tension qui leur a été appliquée. Par contre, les éléments plastiques sont déformables de façon irréversible.

Afin de mieux comprendre l'implication physique de ces éléments dans la croissance on peut parler d'évènements successifs. L'allongement des éléments plastiques, qui n'entraîne quand même pas de changement des dimensions de la cellule est suivi de la contraction des éléments élastiques et la diminution de stress pariétal. Cette diminution induit une baisse de la turgescence de la cellule et par conséquent la diminution de son potentiel hydrique. Les dimensions de la cellule sont modifiées une fois que l'influx d'eau a lieu après la contraction des éléments élastiques (Cosgrove 1987).

### **1.5.2.2 Rôle du cytosquelette dans la croissance apicale**

Dans une cellule, le cytosquelette formé, entre autre, par les filaments d'actine et les microtubules est considéré comme étant un système d'échafaudage interne (Geitmann et Steer 2006). Dans les tubes polliniques, les filaments d'actine ainsi que les microtubules jouent un rôle dans le transport des vésicules jusqu'à l'apex (Geitmann et Emons 2000;

Vidali *et al.* 2001). Les deux éléments du cytosquelette sont colocalisés dans les parties corticales du cytoplasme des tubes polliniques de *Nicotiana tabacum* et de *Lilium longiflorum*. Les éléments du cytosquelette sont orientés en filaments longitudinaux ou légèrement hélicoïdaux dans la zone distale des tubes polliniques (Geitmann et Emons 2000). Le domaine subapical quant à lui comporte des filaments d'actine organisés en une dense mèche corticale (Lovy-Wheeler *et al.* 2005).

L'implication de l'actine dans la croissance apicale ne semble pas se limiter uniquement au transport vésiculaire. L'inhibition de la polymérisation des filaments d'actine, sans pour autant bloquer le flux vésiculaire, inhibe l'élongation des tubes polliniques (Vidali *et al.* 2001). Face à des obstacles mécaniques, c'est le cytosquelette d'actine qui influence le comportement des tubes (Gossot et Geitmann 2007). L'aptitude des tubes à croître et à pénétrer des obstacles est diminuée suite à l'inhibition de la polymérisation des filaments d'actine (Gossot et Geitmann 2007).. Contrairement à l'actine, l'inhibition de la polymérisation des microtubules affecte peu la germination et l'élongation des tubes polliniques des angiospermes; elle ralentit le passage et le mouvement du noyau végétatif et de la cellule générative depuis le grain de pollen vers l'apex du tube (Åström *et al.* 1995).

## 1.6 Structure de la paroi cellulaire végétale

La paroi cellulaire, typique pour les cellules du règne végétal, les champignons et les bactéries, n'est pas une structure inerte. De plus elle remplit une multitude de fonctions indispensables au bon fonctionnement de la machinerie végétale. La paroi joue un rôle essentiel dans l'expansion et la différenciation cellulaire. Elle représente une barrière contre les attaques d'insectes et de pathogènes (Bacic *et al.* 1988) et intervient dans la communication intercellulaire.

Au cours de la croissance, la paroi primaire offre une structure stable mais suffisamment flexible permettant l'expansion cellulaire (Reiter 2002). La caractérisation de mutants

affectant la structure de la paroi chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que la purification des glycosyltransférases ont permis de mieux comprendre la synthèse de la paroi et son rôle dans la croissance cellulaire. La paroi est à la base un réseau de polysaccharides interconnectés. En effet, la paroi primaire est composée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de protéines de structure (Fig.4).

Le poids sec de parois cellulaires de plantes en développement contient approximativement 30% de cellulose, 30% d'hémicelluloses, et 35% de pectines tandis que la proportion des protéines de structure tourne autour de 5% (Cosgrove 1997).

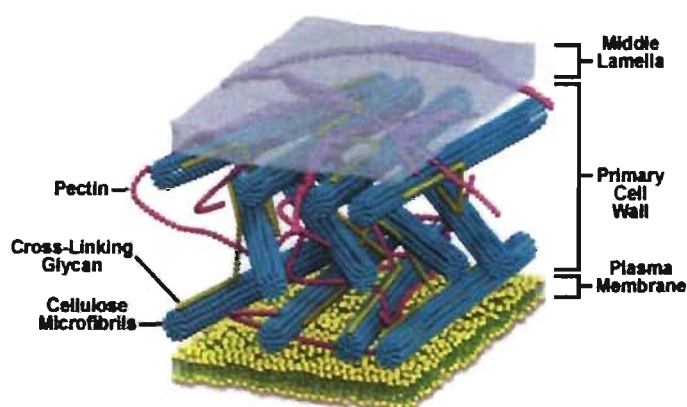


Figure.4. Structure générale d'une paroi cellulaire avec son réseau de polysaccharides  
[www.micro.magnet.fsu.edu](http://www.micro.magnet.fsu.edu)

### 1.6.1 L'ultrastructure de la paroi cellulaire des tubes polliniques

Chez les angiospermes, la paroi cellulaire des tubes polliniques se distingue de la paroi végétale typique par la composition chimique (Geitmann et Steer 2006). La composition de la paroi en région apicale est significativement différente de celle de la région distale. Ces différences le long du tube lui enlèvent le caractère uniforme qui caractérise le modèle généralisé de cellule parenchymateuse (Fig.5). On pourrait dire que le développement

temporel de la paroi d'une cellule en développement est transformé en gradient spatial dans le tube pollinique, car il existe toujours une région restreinte qui est nouvellement formée.

D'une façon générale, la paroi des tubes polliniques comprend deux à trois couches (Heslop-Harrison 1987; Steer *et al.* 1989) avec une couche externe fibrillaire composée majoritairement de pectines, cellulose et des hémicelluloses ainsi qu'une couche plus interne de callose (Mascarenhas 1993). Selon les espèces, la cellulose peut s'associer à la callose comme cela a été révélé par la microscopie électronique à transmission chez *Nicotiana tabacum* L. (Ferguson *et al.* 1998). Uniquement la pectine est présente dans la zone apicale de croissance qui est approximativement hémisphérique. Ici, les pectines ont un degré élevé d'estérification. À l'arrière de la zone apicale, qui s'étend sur environ 5µm, se trouve une zone distale strictement cylindrique. Elle a en plus des pectines plutôt non-estérifiées, de la cellulose, des hémicelluloses et de la callose (Li *et al.* 1994; Li *et al.* 1995; Taylor *et al.* 1997).

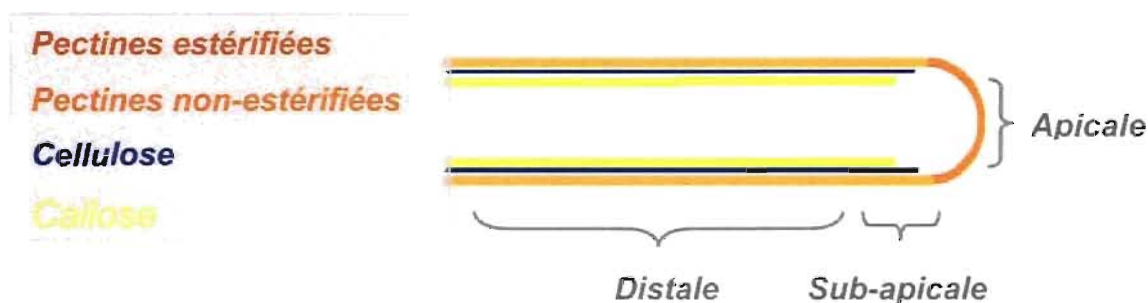


Figure.5. Schématisation de la composition chimique de la paroi d'un tube pollinique d'angiosperme avec spécification des différentes zones le composant.

### 1.6.1.1 Les pectines

Dans la vie pratique, la pectine est largement utilisée pour des fins culinaires notamment l'épaississement de confitures et de gelées. Sur le plan biologique, on retrouve les pectines dans la paroi de toutes les cellules végétales (Ridley *et al.* 2001) ainsi que dans la lamelle moyenne. D'un point de vue chimique, les pectines forment une famille complexe de polysaccharides acides au sein du règne végétal. Les pectines sont constituées d'une chaîne principale d'acide galacturonique lié en 1-4 (Fig.6) ainsi que de chaînes secondaires branchées. Trois polysaccharides pectiques ont été isolés et caractérisés à partir de parois cellulaires primaires: les homogalacturonan, les rhamnogalacturonan-I, et les galacturonans (O'Neill *et al.* 1990; Visser 1996). La structure complexe des pectines implique l'activation d'au moins 53 enzymes au cours de sa biosynthèse (Mohnen 1999). In vitro, les chaînes latérales des pectines semblent être aptes à se connecter aux microfibrilles de cellulose (Zykwinska *et al.* 2005).

Les pectines sont présentes en abondance dans la paroi des tubes polliniques des angiospermes (Geitmann et Steer 2006). Elles sont polymérisées au sein du Golgi. Dans les tubes polliniques, elles sont transportées par les vésicules sécrétrices ce qui permet leur intégration à la paroi de la zone apicale (Levy *et al.* 1992; Hasegawa *et al.* 1998). Une fois secrétées, les pectines subiront, lors de la maturation de la paroi, une dé estérification sous l'effet de l'enzyme pectine méthyl-estérase qui est aussi exportée par voie d'exocytose (Kauss *et al.* 1967; Li *et al.* 1997; Geitmann 1999).

L'immunomarquage des pectines en microscopie à fluorescence a permis de constater que celles de la zone apicale sont hautement estérifiées alors que dans la zone distale elles sont largement dé-estérifiées (Li *et al.* 1994; Geitmann *et al.* 1995). Ceci crée un gradient de degré d'estérification le long du tube pollinique.

Ce gradient confère des propriétés physiques distinctes pour le même composant de la paroi selon son lieu de localisation. La différence des propriétés mécaniques est causée par l'association des pectines dé-estérifiées aux ions de calcium (Fig.7) donnant ainsi naissance à un gel semi rigide (Jarvis 1984; Carpita *et al.* 1993). Chez *Solanum chacoense*, la technique de micro-indentation a physiquement montré que ce gradient chimique est étroitement corrélé avec le gradient d'augmentation de la rigidité de la paroi des tubes et celui de la diminution de sa viscoélasticité (Parre et Geitmann 2005b).

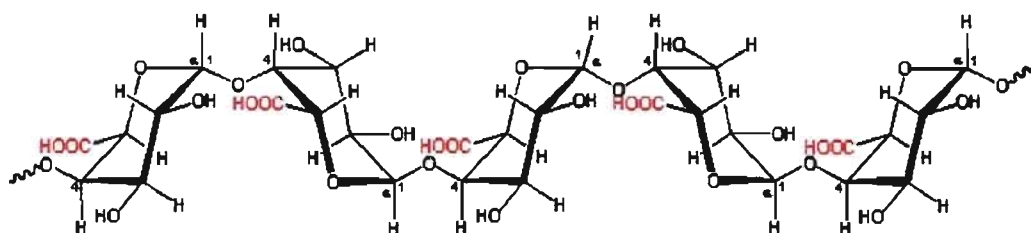


Figure.6. Chaîne principale d'acides polygalacturonique en zig-zag <http://fr.wikipedia.org>.

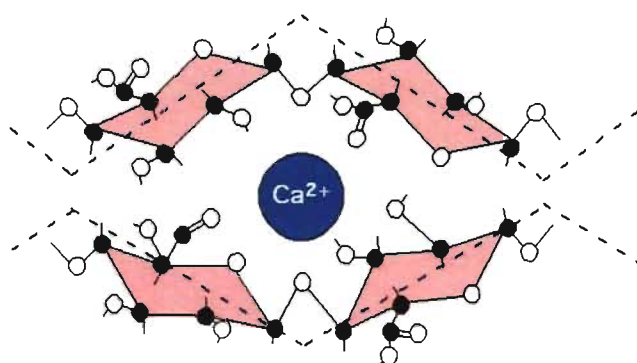


Figure.7. L'association des ions de calcium aux pectines non-estérifiées [www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)



### 1.6.1.2 Le $\beta$ -1,3-glucan

En réponse aux blessures, au stress physiologique ou aux infections, les cellules végétales synthétisent de la callose en vue de réparer les lésions (Esau *et al.* 1967; Delmer 1987). La callose est un polysaccharide linéaire non cristallin avec quelques branchements en 1,6 (Verma *et al.* 2001) (Fig.8). La callose synthase CalS est l'enzyme de synthèse de la callose; elle consiste en multiple sous unités associées à la membrane plasmique (Carpita *et al.* 1993).

La membrane plasmique de tubes polliniques de *Nicotiana alata* ayant poussée in vitro contient une CalS (Doblin *et al.* 2001). Toutefois, cette enzyme est différente de celle activée lors de la blessure de cellules somatiques (Delmer 1999). La callose joue un rôle au cours de la gamétogenèse. Elle sépare les grains de pollen en développement et empêche la fusion de leurs parois cellulaires. Elle est synthétisée en grandes proportions dans la paroi des tubes polliniques in vivo ainsi qu'en culture in vitro.

De plus, elle représente le principal composant des bouchons formés de façon régulière permettant de segmenter les tubes (Read *et al.* 1992; Read *et al.* 1993; Geitmann 1999). En plus de former des bouchons et de faire défaut à l'apex (Heslop-Harrison 1987), la callose est un composant de la paroi distale dont des dépôts visibles lors de son immunomarquage commencent seulement 30  $\mu$ m derrière la zone apicale de croissance dans *Nicotiana alata* (Ferguson *et al.* 1998). Mécaniquement, la callose, bien qu'étant un composant pariétal amorphe est impliquée dans la résistance de la paroi des grains au stress de tension et des tubes au stress de tension et de déformation (Parre et Geitmann 2005a).

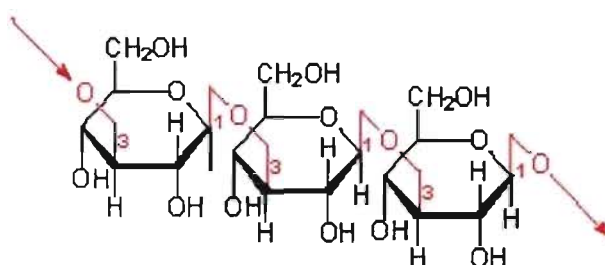


Figure.8. Structure chimique de la callose [www.biologie.uni-hamburg.de](http://www.biologie.uni-hamburg.de)

### 1.6.1.3 La cellulose : synthèse, cristallisation et propriétés physico-chimiques

La cellulose est essentiellement connue comme une importante matière première industrielle. Elle sert à la fabrication de pâtes à papier, de fibres textiles artificielles, certains médicaments et sert d'isolant thermique. La cellulose, une macromolécule de structure simple et majoritairement produite par les plantes vasculaires se place en tête des polysaccharides les plus abondants sur le globe (Brown 2004; Saxena *et al.* 2005). La cellulose est un composant commun aux parois cellulaires primaires et secondaires. D'un point de vue chimique, la cellulose consiste en des polymères non ramifiés de  $\beta$ -1,4 glucan arrangés en chaînes linéaires (Fig.9). La polymérisation des résidus de glucose en  $\beta$ -1,4-glucose est catalysée par l'enzyme cellulose synthase. Les chaînes polymérisées sont ensuite assemblées pour former des microfibrilles via des liaisons hydrogène.

La microscopie électronique a démontré son existence sous forme de microfibrilles (Frey-Wyssling 1976). Leur assemblage par un complexe d'enzymes associé à leurs terminaisons en croissance (Roelofsen 1958) ne fût que prédiction. Par la suite, la visualisation par cryofracture des sites de synthèse de la cellulose chez l'algue verte *Oocystis apiculata* (Brown *et al.* 1976) vient confirmer cette prédiction.

Chez les plantes vasculaires, les complexes de synthèse de la cellulose ont été visualisés par la microscopie électronique (Fig.10-11). Ils font partie de la membrane plasmique et ont l'apparence de rosettes de 25-30 nm de diamètre comportant chacune six sous-unités (Mueller *et al.* 1980). Les premiers gènes *CesA* (cellulose synthase) ont été clonés à partir de bactéries (Aloni *et al.* 1982; Matthysse *et al.* 1995). En se basant sur la séquence de l'ADN bactérien, les premiers gènes *CesA* chez les plantes ont été découverts chez le coton (Pear *et al.* 1996). Cellulose synthase comprend une famille de 10 membres chez *Arabidopsis* (Holland *et al.* 2000; Richmond *et al.* 2000). Certains de ces gènes comme *AtCesA1*, *AtCesA3*, et *AtCesA5* sont impliqués dans la synthèse de cellulose des parois cellulaires primaires uniquement (Fagard *et al.* 2000; Scheible *et al.* 2001; Burn *et al.* 2002). Par contre, d'autres gènes comme *AtCesA4*, *AtCesA7*, et *AtCesA8* sont requis pour la synthèse de la paroi secondaire. De plus, l'interaction entre ces 3 isoformes de *CesA* est essentielle à la synthèse de cellulose (Taylor *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2003).

L'arrangement des rosettes au niveau de la membrane plasmique a été étudié grâce à la cryofracture et la microscopie électronique. La plus grande diversité est présente chez les algues. Les complexes de synthèse peuvent être disposés en rosettes solitaires, en rangées linéaires (Kiermayer *et al.* 1979), en rangées multiples de rosettes (Willison *et al.* 1978) ou encore en rangées diagonales (Mizuta *et al.* 1992). La biosynthèse de la cellulose repose sur deux étapes que sont la polymérisation et la cristallisation (Saxena *et al.* 2005).

Les gènes cellulose synthase-like (CSL) font partie d'une famille de six sous-familles de gènes identifiés chez *Arabidopsis* en premier (Cutler *et al.* 1997; Saxena *et al.* 1997). La sous-famille CslD partage 45% à 50% de similarité avec les gènes *CesA* codant pour l'enzyme CelS (Richmond *et al.* 2000). Le gène NaCslD1, membre de la sous-famille CslD est fortement exprimé dans les grains de pollen ainsi que dans les tubes polliniques de *Nicotiana glauca* et coderait pour des sous-unités  $\beta$ -glucan synthase impliquées dans la synthèse de la paroi des tubes (Doblin *et al.* 2001).

Chez *Acetobacter xylinum*, le taux de polymérisation est influencé par la cristallisation puisque les deux processus sont interdépendants (Benziman *et al.* 1980). Chez les fibres de coton, la production de cellulose non cristalline augmente en présence de l'herbicide CGA 325' 615 (Peng *et al.* 2001). En fait, le 1-cyclohexyl-5-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-1 $\lambda$ 4,2,4,6-thiatriazin-3-amine ou CGA 325' 615 inhibe la synthèse de cellulose cristalline. L'herbicide affecte l'architecture des rosettes en influençant l'oxydation du zinc-finger binding domain nécessaire pour la stabilité des rosettes (Kurek *et al.* 2002).

La cellulose est la cible de digestion par la cellulase dans divers tissus végétaux et ce à différents stades de leur développement. On détecte l'activité enzymatique dans les zones d'abscission des feuilles (Lewis *et al.* 1979) et des fruits (Greenberg *et al.* 1975), lors de la sénescence des styles et des anthères (Sexton *et al.* 1990) ou encore lors de l'initiation des racines adventives (Linkins *et al.* 1973). La cellulase commerciale est un complexe d'enzymes qui permet la digestion de la cellulose en deux étapes. La conversion de la cellulose en glucose débute par l'hydratation des chaînes par l'enzyme C1 et se termine par l'action de deux enzymes hydrolytiques que sont Cx et  $\beta$  glucosidase.

Mécaniquement, les liaisons  $\beta$ -1,4 entre les unités de glucose et les liaisons hydrogène entre les chaînes donnent naissance à une structure linéaire rigide formant ainsi des fibres assez stables respectivement. L'implication mécanique de la cellulose dans la croissance apicale n'a pas été exhaustivement explorée. Le 2,6-dichlorobenzonitrile ou DCB, un inhibiteur de la biosynthèse de la cellulose, cause la rupture ou la distorsion des tubes de *Lilium auratum* et de *Pétunia hybrida* qui adoptent des formes bulbeuses (Anderson *et al.* 2002). De plus, isoxaben, un herbicide inhibiteur de la biosynthèse de la cellulose, cause un renflement apical ainsi que la diminution du taux de cellulose le long des tubes de conifères (Lazzaro *et al.* 2003).

Les mutations affectant les membres de la famille *CesA* chez *Arabidopsis* se soldent par une réduction de la synthèse de la cellulose. Ce qui se traduit pratiquement par différents phénotypes comme le renflement racinaires ou encore des irrégularités de la morphologie vasculaire (Arioli *et al.* 1998; Robert *et al.* 2004; Somerville *et al.* 2004). Ces mutants n'ont pas été étudiés pour leur effet sur la croissance du tube pollinique.

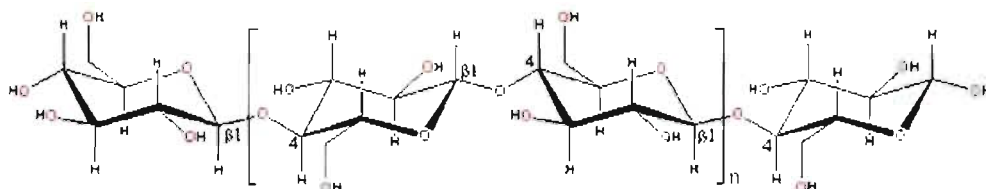


Figure.9. Structure moléculaire de la cellulose [www.lsbu.ac.uk](http://www.lsbu.ac.uk).

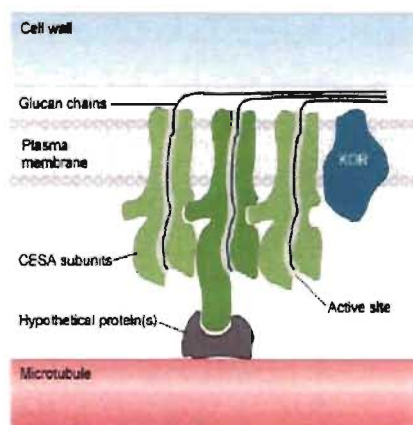


Figure.10. Un modèle hypothétique du complexe de synthèse de la cellulose (Somerville 2006)

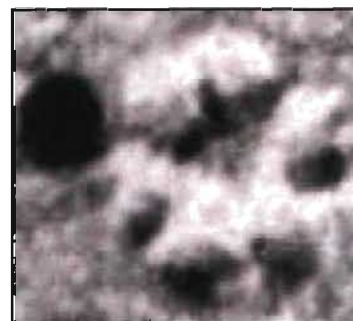


Figure.11. Micrographe d'immunomarquage d'une rosette chez une plante vasculaire *Vigna angularis* (Kimura *et al.* 1999). La tache noire à gauche correspond au grain d'or vu en microscopie électronique à transmission

### 1.6.1.4 Les xyloglucanes: biosynthèse et structure

Les xyloglucanes sont les hémicelluloses les plus abondants de la paroi primaire des angiospermes (Hayashi 1989). Les hémicelluloses ainsi que les pectines sont décrits comme étant des polysaccharides matrice de la paroi cellulaire. Les hémicelluloses doivent leur appellation à leur structure moins complexe que celle de la cellulose et à leur coexistence avec elle dans la paroi cellulaire. Ils sont constitués d'une chaîne de glucose  $\beta$ -1,4 et de courtes chaînes latérales de xylose, galactose et fucose (McNeil *et al.* 1984; Reiter 2002) (Fig. 12). À cause de la présence de leurs chaînes latérales, les xyloglucanes ne sont pas même susceptibles de constituer des fibrilles. Comme les pectines, les xyloglucanes sont synthétisés dans des vésicules golgiennes ensuite exportés dans l'espace périplasmique par exocytose.

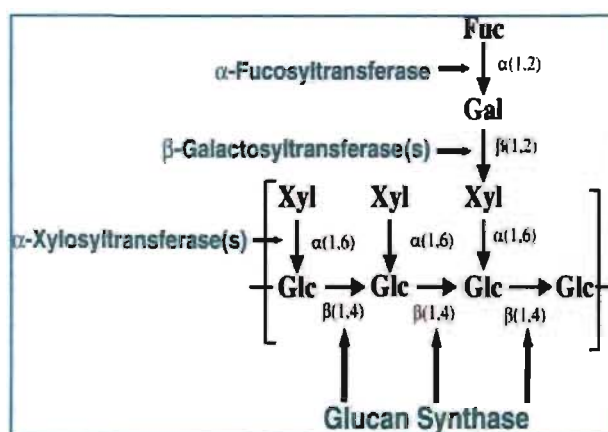


Figure.12. Structure d'un fragment de xyloglucane montrant les xyloses ainsi que les résidus de galactose et de fucose. Les enzymes impliquées dans la synthèse du xyloglucanes paraissent en vert sur la figure [www.prl.msu.edu/cellwallnet](http://www.prl.msu.edu/cellwallnet)

## 1.7 Le réseau cellulose–xyloglucanes

### 1.7.1 Formation du réseau : conditions d'assemblage

Les xyloglucanes de la paroi ne sont pas organisés en structure cristalline (Cosgrove 1997). Par contre, une organisation les orientant parallèlement aux microfibrilles de cellulose a été montrée par étude spectroscopique (Morikawa *et al.* 1978; McCann *et al.* 1992; Séné *et al.* 1994). De plus, les xyloglucanes sont susceptibles de se lier étroitement à la surface des microfibrilles (Hayashi 1989) (Fig.13).

La modélisation moléculaire *in vitro* révèle que le L-fucose stabiliserait une configuration planaire essentielle pour optimiser la liaison xyloglucan/cellulose (Hayashi *et al.* 1994; Levy *et al.* 1997). Chez le mutant *murl* d'*Arabidopsis*, L-galactose remplace L-fucose des chaînes latérales du xyloglucane (Zabackis *et al.* 1996). La réduction de la résistance au stress de tension au niveau des tiges de ce mutant pourrait traduire une faiblesse de la liaison xyloglucan/cellulose (Reiter *et al.* 1993).

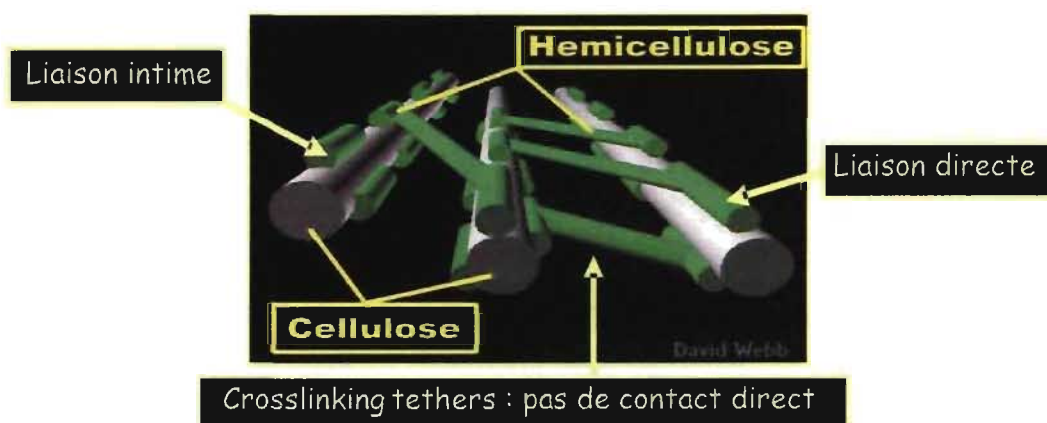


Fig.13. Les trois zones de liaison entre les microfibrilles de cellulose et les chaînes de xyloglucanes au sein du réseau cellulose/xyloglucanes des parois primaires des plantes vasculaires

## 1.8 Mécanique de la croissance apicale:

### 1.8.1 Contraintes physiques

La distribution des stress au sein d'une cellule est déterminée par sa morphologie (Baskin 2005). Dans une cellule cylindrique isolée, le stress circonférentiel est double de celui agissant longitudinalement ou dans l'apex (Probine *et al.* 1962). Pour pouvoir limiter l'expansion à l'apex, ce dernier doit être plus souple que la partie cylindrique distale. L'expansion est possible grâce à la nature des pectines qui sont estérifiées dans la zone apicale et non estérifiées en distale. Il existe donc un gradient de composition chimique de la paroi cellulaire le long du tube (Geitmann 1999). Ce gradient se traduit par un gradient des propriétés physiques (Geitmann et Parre 2004). La zone distale des tubes n'est pas soumise à l'expansion (Haberlandt 1887; Reinhardt 1892). L'application de pectine méthyle estérase exogène rend la paroi apicale rigide et en conséquence induit un épaissement de la paroi apicale, accompagné de l'inhibition de la croissance des tubes polliniques (Bosch *et al.* 2005) (Parre et Geitmann. 2005b).

Plusieurs modèles théoriques pour la croissance apicale ont été développés. Un modèle biomécanique couvrant la croissance apicale chez les hyphes a été proposé (Goriely *et al.* 2003). Dans ce modèle, la paroi cellulaire à l'apex des filaments mycéliens est décrite comme étant une membrane élastique. Ses propriétés élastiques dépendent de la géométrie de la cellule (Goriely *et al.* 2003).

L'expansion de la surface cellulaire a été étudiée chez les poils racinaires de *Medicago truncatula* (Shaw *et al.* 2000; Dumais *et al.* 2004). À l'apex, le taux d'expansion est distribué suivant un gradient méridional. L'expansion maximale est détectée au niveau ou tout près du pôle du dôme (Dumais *et al.* 2004). Chez *Medicago truncatula*, trois zones d'expansion de surfaces cellulaires ont été caractérisées chez les poils racinaires (Fig.3) (Shaw *et al.* 2000).



## 1.9 Objectifs et motivations

La partie distale d'un tube pollinique en croissance n'est autre que le résultat de la déestérification des pectines de l'apex dans le but de le stabiliser ainsi que de la synthèse continue de nouveaux matériels. En effet, la callose et la cellulose figurent parmi ces composants nouvellement synthétisés. La géométrie cylindrique qui caractérise la partie distale permet de par sa composition chimique de supporter la force de turgescence sans subir d'extension sous son effet. Le maintien de la forme cylindrique dans la partie distale garantit une croissance par extension de la partie apicale exclusivement. En conséquence, la composition chimique distale est d'une importance cruciale puisque c'est la mise en place de matériel suffisamment rigide pour maintenir l'intégrité de la paroi face au stress généré par la turgescence.

Le réseau cellulose/hémicelluloses est connu pour conférer du support mécanique aux parois des cellules en croissance chez les plantes vasculaires. L'existence d'un tel réseau et son implication dans la croissance apicale des tubes polliniques n'est pas bien élucidée. Ceci explique l'intérêt porté sur ce réseau ainsi qu'à ses deux composants dans les différents chapitres composant ce mémoire. De plus, les faibles proportions de la cellulose dans la paroi des tubes suscitent un intérêt particulier sur la spécificité de son rôle. Les pectines et la callose, composants majeurs de la paroi des tubes, sont largement couverts dans des articles publiés par notre laboratoire. Leurs rôles ainsi que leur participation mécanique respectifs dans la croissance apicale des tubes polliniques sont relativement bien connus.

Par ailleurs, le choix de *Lilium orientalis* et de *Solanum chacoense* porte une marque de distinction entre les deux représentants de la famille des angiospermes.

Cellulose et xyloglucanes sont des composants essentiels de la paroi primaire des plantes vasculaires. Sont-ils également présents dans la paroi des tubes polliniques et quelle est leur implication dans un mode de croissance apicale.

## 1.10 Approches et stratégies

- L'investigation de l'**existence du réseau cellulose/xyloglucanes** dans la paroi cellulaire des tubes polliniques de *Lilium longiflorum* et *Solanum chacoense* fera appel à la microscopie à fluorescence et électronique à transmission.
- L'**implication de la cellulose dans la mécanique de croissance** sera révélée par les changements morphologiques des tubes causés par sa digestion par la cellulase et l'inhibition de sa synthèse par l'herbicide CGA. La microscopie à fluorescence localisera les différents composants avant et après traitements.
- L'investigation de l'**orientation des microfibrilles** au sein de la paroi des tubes de deux espèces nécessitera des observations sous microscopie électronique à balayage, précédées de digestion ciblée des composants de la paroi.

## 1.11 Organisation du mémoire

Quatre chapitres constituent ce mémoire :

Le premier chapitre, comme on l'a vu, est une introduction générale à la reproduction sexuée et la fécondation chez les angiospermes. Il couvre aussi la mécanique croissance en général et celle de la croissance apicale en particulier. Ce chapitre expose également la composition de la paroi primaire et celle des tubes polliniques.

Un deuxième chapitre sous forme d'article traitera du rôle de la cellulose en général ainsi que son orientation par rapport à l'axe d'élongation. Jens Kroeger a contribué dans l'interprétation d'un point de vue physique des résultats concernant l'orientation des microfibrilles dans la paroi des tubes.

Un troisième chapitre sera concentré sur la présence des xyloglucanes dans la paroi des tubes polliniques. L'implication éventuelle du fucose de leurs chaînes latérales dans la croissance apicale sera couverte. Davina Sumbal, au cours de son stage au sein du laboratoire, m'a assistée à réaliser les expériences de la deuxième partie de ce chapitre.

Le quatrième chapitre discutera le rôle joué par la cellulose et le réseau cellulose/xyloglucanes dans la croissance apicale et précisera les perspectives futures permettant de mieux localiser les composants pariétaux chez le pollen et de leur affecter des rôles plus précis.

## 1.12 Bibliographie

- Aloni, Y., D. P. Delmer and M. Benziman (1982). "Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4- $\beta$ -D-glucan: activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, Polyethylene Glycol, and a protein factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(21): 6448-6452.
- Anderson, J. R., W. S. Barnes and P. Bedinger (2002). "2,6-dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes." Journal of Plant Physiology **159**(1): 61-67.
- Arioli, T., L. C. Peng, A. S. Betzner, J. Burn, W. Wittke, W. Herth, C. Camilleri, H. Höfte, J. Plazinski, R. Birch, A. Cork, J. Glover, J. Redmond and R. E. Williamson (1998). "Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*." Science **279**(5351): 717-720.
- Åström, H., O. Sorri and M. Raudaskoski (1995). "Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in *Tobacco* pollen tubes." Sexual Plant Reproduction **8**(2): 61-69.
- Bacic, A., P. J. Harris and B. A. Stone (1988). "Structure and function of plant cell walls." In J Priess, ed, The Biochemistry of Plants. Academic Press, New York. pp 297-371.
- Baskin, T. I. (2005). "Anisotropic expansion of the plant cell wall." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**: 203-222.
- Baskin, T. I., H. T. H. M. Meekes, B. M. Liang and R. E. Sharp (1999). "Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils." Plant Physiology **119**(2): 681-692.
- Benziman, M., C. H. Haigler, R. M. Brown, A. R. White and K. M. Cooper (1980). "Cellulose Biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in

- Acetobacter xylinum*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(11): 6678-6682.
- Bosch, M., A. Y. Cheung and P. K. Hepler (2005). "Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth." Plant Physiology **138**(3): 1334-1346.
- Brown, R. M. (2004). "Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?" Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry **42**(3): 487-495.
- Brown, R. M., Jr. and D. Montezinos (1976). "Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and oriented complexes in association with the plasma membrane." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**: 143-147
- Burn, J. E., C. H. Hocart, R. J. Birch, A. C. Cork and R. E. Williamson (2002). "Functional analysis of the cellulose synthase genes Cesa1, Cesa2, and Cesa3 in *Arabidopsis*." Plant Physiology **129**(2): 797-807.
- Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary-cell walls in flowering plants - Consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth." Plant Journal **3**(1): 1-30.
- Cosgrove, D. J. (1987). "Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth." Plant Physiology **84**(3): 561-564.
- Cosgrove, D. J. (1997). "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants." Annual Review of Cell and Developmental Biology **13**: 171-201.
- Cosgrove, D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall." Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**(11): 850-861.
- Cutler, S. and C. Somerville (1997). "Cellulose synthesis: cloning *in silico*." Current Biology **7**: R108-R111.
- Delmer, D. P. (1987). "Cellulose biosynthesis." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **38**: 259-290.
- Delmer, D. P. (1999). "Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**: 245-276.

- Doblin, M. S., L. De Melis, E. Newbigin, A. Bacic and S. M. Read (2001). "Pollen tubes of *Nicotiana alata* express two genes from different beta-glucan synthase families." Plant Physiology **125**(4): 2040-52.
- Duarte, P., R. Figueiredo, S. Pereira and J. Pissarra (2006). "Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development." Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique **84**(5): 737-749.
- Dumais, J., S. R. Long and S. L. Shaw (2004). "The mechanics of surface expansion anisotropy in *Medicago truncatula* root hairs." Plant Physiology **136**(2): 3266-3275.
- Esau, K. and J. Cronshaw (1967). "Relation of *Tobacco* mosaic virus to the host cells." Journal of Cell Biology **33**(3): 665-678.
- Fagard, M., T. Desnos, T. Desprez, F. Goubet, G. Refregier, G. Mouille, M. McCann, C. Rayon, S. Vernhettes and H. Hofte (2000). "*PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*." Plant Cell **12**(12): 2409-2424.
- Ferguson, C., T. T. Teeri, M. Siika-aho, S. M. Read and A. Bacic (1998). "Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*." Planta **206**(3): 452-460.
- Frey-Wyssling, A. (1976). "The plant cell wall." Gebruder Borntraeger
- Geitmann, A. (1999). "The rheological properties of the pollen tube cell wall." In: Cresti M, Cai G, Moscatelli A (eds) Fertilization in higher plants: 283-297.
- Geitmann, A. and A. M. C. Emons (2000). "The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth." Journal of Microscopy **198**(3): 218-245.
- Geitmann, A., J. Hudak, F. Vennigerholz and B. Walles (1995). "Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens* - Implications for the self-incompatibility reaction." Journal of Plant Physiology **147**(2): 225-235.

- Geitmann, A. and E. Parre (2004). "The local cytomеchanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements." Sexual Plant Reproduction **17**(1): 9-16.
- Geitmann, A. and M. Steer (2006). "The architecture and properties of the pollen tube cell wall." Plant Cell Monographs **3**: 177-200.
- Goriely, A. and M. Tabor (2003). "Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes." Journal of Theoretical Biology **222**(2): 211-218.
- Gossot, O. and A. Geitmann (2007). "Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton." Planta **226**(2): 405-416.
- Green, P. B. (1980). "Organogenesis - a biophysical view." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **31**: 51-82.
- Greenberg, J., R. Goren and R. J. (1975). "The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature *Shamouti* orange fruits." Physiology Plant **34**: 1-7.
- Haberlandt, G. (1887). "Über die Beziehungen zwischen Function und Lage des Zellkernes bei den Pflanzen." Fischer, Jena, Germany.
- Hasegawa, Y., S. Nakamura, S. Kakizoe, M. Sato and N. Nakamura (1998). "Immunocytochemical and chemical analyses of golgi vesicles isolated from the germinated pollen of *Camellia japonica*." Journal of Plant Research **111**(1103): 421-429.
- Hayashi, T. (1989). "Xyloglucans in the primary-cell wall." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**: 139-168.
- Hayashi, T., K. Ogawa and Y. Mitsuishi (1994). "Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose." Plant Cell Physiology **35**: 1199-205.
- Hepler, P. K., L. Vidali and A. Y. Cheung (2001). "Polarized cell growth in higher plants." Annual Review of Cell & Developmental Biology **17**: 159-87.
- Heslop-Harrison, J. (1987). "Pollen germination and pollen-tube growth." International Review of Cytology **107**: 1-78.

- Heslop-Harrison, Y. and K. R. Shivanna (1977). "The receptive surface of the Angiosperm stigma." Annals of Botany **41**(6): 1233-1258.
- Hogetsu, T., H. Shibaoka and M. Shimokoriyama (1974). " Involvement of cellulose synthesis in actions of gibberellin and kinetin on cell expansion. Gibberellin-coumarin and kinetin-coumarin interactions on stem elongation " Plant Cell Physiology **15**: 265–272.
- Holland, N., D. Holland, T. Helentjaris, K. S. Dhugga, B. Xoconostle-Cazares and D. P. Delmer (2000). "A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family." Plant Physiology **123**(4): 1313-1324.
- Hristova, K., M. Lam, T. Feild and T. L. Sage (2005). "Transmitting tissue ECM distribution and composition, and pollen germinability in *Sarcandra glabra* and *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae)." Annals of Botany **96**(5): 779-791.
- Kauss, H. and W. Z. Hassid (1967). "Enzymic introduction of the methyl ester groups of pectins." Journal of Biological Chemistry **242**: 3449–3453.
- Kiermayer, O. and U. B. Sleytr (1979). "Hexagonally ordered rosettes of particles in the plasma-membrane of *Micrasterias-Denticulata* Breb and their significance for microfibril formation and orientation." Protoplasma **101**(1-2): 133-138.
- Kimura, S., W. Laosinchai, T. Itoh, X. Cui, C. R. Linder and R. M. Brown, Jr. (1999). "Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*." Plant Cell **11**(11): 2075-2086.
- Kurek, I., Y. Kawagoe, D. Jacob-Wilk, M. Doblin and D. Delmer (2002). "Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(17): 11109-11114.
- Lancelle, S. A. and P. K. Hepler (1992). "Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longiflorum*." Protoplasma **167**(3 - 4): 215-230.



- Lazzaro, M. D., J. M. Donohue and F. M. Soodavar (2003). "Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes." Protoplasma **220**(3 - 4): 201.
- Lennon, K. A. and E. M. Lord (2000). "*In vivo* pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana* I. Tube cell cytoplasm and wall." Protoplasma **214**(1-2): 45-56.
- Lennon, K. A., S. p. Roy, P. K. Hepler and E. M. Lord (1998). "The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* and the path of pollen tube growth." Sexual Plant Reproduction **11**(1): 49-59.
- Levy, S., G. Maclachlan and L. A. Staehelin (1997). "Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations." Plant Journal **11**(3): 373-386.
- Lewis, L. N. and D. E. Koehler (1979). "Cellulase in the kidney bean seedling." Planta **146** 1-5.
- Li, Y., F. Chen, H. Linskens and M. Cresti (1994). "Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants." Sexual Plant Reproduction **7**(3): 145-152.
- Li, Y. Q., C. Faleri, A. Geitmann, H. Q. Zhang and M. Cresti (1995). "Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L." Protoplasma **189**(1 - 2): 26-36.
- Li, Y. Q., A. Moscatelli, G. Cai and M. Cresti (1997). "Functional interactions among cytoskeleton membranes and cell wall in pollen tube of flowering plants." International Review of Cytology **176**: 133-199.
- Linkins, A. E., L. N. Lewis and R. L. Palmer (1973). "Hormonally induced changes in stem and petiole anatomy and cellulase enzyme patterns in *Phaseolus vulgaris* L." Plant Physiology **52** 554-560.
- Lord, E. (2000). "Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme." Trends in Plant Science **5**(9): 368-373.

- Lovy-Wheeler, A., K. L. Wilsen, T. I. Baskin and P. K. Hepler (2005). "Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube." Planta **221**(1): 95-104.
- Mascarenhas, J. P. (1993). "Molecular mechanisms of pollen-tube growth and differentiation." Plant Cell **5**(10): 1303-1314.
- Matthysse, A. G., S. White and R. Lightfoot (1995). "Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*." Journal of Bacteriology **177**: 1069-1075.
- McCann, M. C., M. Hammouri, B. Wilson R and R. K. P (1992). "Fourier transform infrared microspectroscopy: a new way to look at plant cell walls." Plant Physiology **100**: 1940-47.
- McNeil, M., A. G. Darvill, S. C. Fry and P. Albersheim (1984). "Structure and function of the primary cell walls of plants." Annual Review of Biochemistry **53**(1): 625-663.
- Mizuta, S. and R. M. Brown (1992). "High-resolution analysis of the formation of cellulose synthesizing complexes in *Vaucheria-Hamata*." Protoplasma **166**(3-4): 187-199.
- Mohnen, D. (1999). "Biosynthesis of pectins and galactomannans. In Pinto, B.M. (Ed.)." Carbohydrates and their Derivatives Including Tannins, Cellulose, and Related Lignins. Elsevier, Oxford 497-527.
- Morikawa, H., R. Hayashi and M. Senda (1978). "Infrared analysis of pea stem cell walls and oriented structure of matrix polysaccharides in them." Plant Cell Physiology **19**: 1151-59.
- Mueller, S. C. and R. M. Brown (1980). "Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher-plants." Journal of Cell Biology **84**(2): 315-326.
- O'Neill, M. A., A. G. Darvill and P. Albersheim (1990). "The pectic polysaccharides of primary cell walls." In: Dey, D.M. (Ed.), Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, London **2**: 415-441.
- Parre, E. and A. Geitmann (2005a). "More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes." Plant Physiology **137**(1): 274-286.

- Parre, E. and A. Geitmann (2005b). "Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*." Planta **220**(4): 582-592.
- Pear, J. R., Y. Kawagoe, W. E. Schreckengost, D. P. Delmer and D. M. Stalker (1996). "Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(22): 12637-12642.
- Peng, L., F. Xiang, E. Roberts, Y. Kawagoe, L. C. Greve, K. Kreuz and D. P. Delmer (2001). "The experimental herbicide CGA 325'615 inhibits synthesis of crystalline cellulose and causes accumulation of non-crystalline - $\beta$ -1,4-gucan associated with CesA protein." Plant Physiology **126**(3): 981-992.
- Probine, M. C. and R. D. Preston (1962). "Cell growth and the structure and mechanical properties of the wall in internodal cells of *Nitella opaca*: II. Mechanical properties of the walls." Journal of Experimental Botany **13**(1): 111-127.
- Read, S. M., A. Bacic and A. E. Clarke (1992). "Control of morphology and generative nucleus division in cultured pollen tubes of *Nicotiana*." In D Mulcahy, E Ottaviano, eds, Angiosperm Pollen & Ovules. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany: 162-167.
- Read, S. M., A. E. Clarke and A. Bacic (1993). "Requirements for division of the generative nucleus in cultured pollen tubes of *Nicotiana*." Protoplasma **174**(3): 101-115.
- Reinhardt, M. O. (1892). "Das Wachsthum der Pilzhyphen." Jahrb wiss Bot **23**: 479-566.
- Reiter, W. D. (2002). "Biosynthesis and properties of the plant cell wall." Current Opinion in Plant Biology **5**(6): 536-542.
- Reiter, W. D., C. C. S. Chapple and C. R. Somerville (1993). "Altered growth and cell-walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*." Science **261**(5124): 1032-1035.
- Richmond, T. A. and C. R. Somerville (2000). "The cellulose synthase superfamily." Plant Physiology **124**(2): 495-498.

- Ridley, B. L., M. A. O'Neill and D. Mohnen (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." Phytochemistry **57**(6): 929.
- Robert, S., G. Mouille and H. Hofte (2004). "The mechanism and regulation of cellulose synthesis in primary walls: lessons from cellulose-deficient *Arabidopsis* mutants." Cellulose **11**: 351–64.
- Roelofsen, A. (1958). "Cell wall structure as related to surface growth. Some supplementary remarks on multinet growth." Acta Botanica Neerlandica **7**: 77-89
- Saxena, I. M. and R. M. Brown (1997). "Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: Sequence analysis of processive beta-glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW'." Cellulose **4**(1): 33-49.
- Saxena, I. M. and R. M. J. Brown (2005). "Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts." Annals of Botany **96**(1): 9-21.
- Scheible, W. R., R. Eshed, T. Richmond, D. Delmer and C. Somerville (2001). "Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(18): 10079-10084.
- Séné, C. F. B., M. C. McCann, R. H. Wilson, R. Grinter and (1994). "Fourier-transform Raman and Fourier transform infrared spectroscopy. An investigation of five higher plant cell walls and their components." Plant Physiology **106**: 1623–31.
- Sexton, R., E. Delcampillo, D. Duncan and L. N. Lewis (1990). "The purification of an anther cellulase (Beta(1-4)4-Glucan Hydrolase) from *Lathyrus-Odoratus* L and its relationship to the similar enzyme found in abscission zones." Plant Science **67**(2): 169-176.
- Shaw, S. L., J. Dumais and S. R. Long (2000). "Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*." Plant Physiology **124**(3): 959-70.
- Somerville, C. (2006). "Cellulose synthesis in higher plants." Annual Review of Cell and Developmental Biology **22**(1).

- Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk and H. Youngs (2004). "Toward a systems approach to understanding plant cell walls." Science **306**(5705): 2206-2211.
- Steer, M. W. and J. M. Steer (1989). "Pollen-tube tip growth." New Phytologist **111**(3): 323-358.
- Taiz, L. (1984). "Plant-cell expansion - Regulation of cell-wall mechanical-properties." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **35**: 585-657.
- Taylor, L. P. and P. K. Hepler (1997). "Pollen germination and tube growth." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 461-491.
- Taylor, N. G., R. M. Howells, A. K. Huttly, K. Vickers and S. R. Turner (2003). "Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(3): 1450-1455.
- Taylor, N. G., S. Laurie and S. R. Turner (2000). "Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*." Plant Cell **12**(12): 2529-2540.
- Verma, D. P. S. and Z. Hong (2001). "Plant callose synthase complexes." Plant Molecular Biology **47**(6): 693-701.
- Vidali, L. and P. K. Hepler (2001). "Actin and pollen tube growth." Protoplasma **215**(1-4): 64-76.
- Visser, J., Voragen, A.G.J. (Eds.) (1996). "Pectins and pectinases, progress in biotechnology." **14**(Elsevier, Amsterdam): 263-274.
- Wasteneys, G. O. and M. Fujita (2006). "Establishing and maintaining axial growth: wall mechanical properties and the cytoskeleton." Journal of Plant Research **119**(1): 5-10.

- Whittington, A. T., O. Vugrek, K. J. Wei, N. G. Hasenbein, K. Sugimoto, M. C. Rashbrooke and G. O. Wasteneys (2001). "MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants." Nature **411**(6837): 610-613.
- Willison, J. H. and R. M. Brown, Jr. (1978). "Cell wall structure and deposition in *Glaucozystis*." Journal of Cell Biology **77**(1): 103-119.
- Zabackis, E., W. S. York, M. Pauly, S. Hantus, W.-D. Reiter, C. C. S. Chapple, P. Albersheim and A. Darvill (1996). "Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis murl*." Science **272**(5269): 1808-1810.
- Zykwinska, A. W., M.-C. J. Ralet, C. D. Garnier and J.-F. J. Thibault (2005). "Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose." Plant Physiology **139**(1): 397-407.

## ***Chapitre II : Crystalline cellulose has the role of a transient stabilizer in the cell wall expansion zone of growing pollen tubes***

Leila Aouar, Anja Geitmann

"En préparation pour soumission dans Planta"

### **Abstract**

Cellulose is the principal tensile stress resistant component of the load-bearing system in primary plant cell walls. In the rapidly growing pollen tube the amount of cellulose in the cell wall is untypically low. Therefore, we wanted to investigate whether its load-bearing function is nevertheless important for the architecture of this cell. Enzymatic digestion with cellulase and inhibition of cellulose crystal formation with CGA 3259615 resulted in the formation of tubes with increased diameter in *Solanum chacoense* and *Lilium orientalis* when present during germination. In pre-germinated tubes, application of both agents resulted in transient arrest of growth accompanied by the formation of an apical swelling indicating a role in stabilizing this region of the cell. Once growth resumes in the presence of cellulase, however, the cell wall in the newly formed tube shows increased amounts of pectins, presumably to compensate for the reduced amount of cellulose. In pre-germinated pollen tubes, the distal diameter remained unchanged during cellulase treatment indicating that other cell wall components are responsible for tensile stress resistance in this region. Scanning electron microscopy of pollen tubes subjected to digestion of matrix polysaccharides revealed the orientation of the cellulose microfibrils in the outer layer of the cell wall. In both *Lilium* and *Solanum*, the net orientation of cellulose microfibrils in the shank of the tube seemed to be approximately parallel to the long axis or at an angle under 45°, another indication that cellulose is not the main stress-bearing component against turgor pressure induced tensile stress in the mature part of the cell.

## 2.1 Introduction

The pollen tube is an extremely long, cylindrical cell whose function is the delivery of the sperm cells from the pollen grain to the ovule in order to allow fertilization in flowering plants. Pollen tube growth is highly polarized and confined to the tip of the cell where new membrane and cell wall material are continuously inserted. Deposition of newly synthesized cell wall material provided by the secretory vesicles deriving from Golgi bodies occurs concomitantly with expansion of the existing cell wall which is powered by the turgor controlled influx of water. Plant cell walls provide structure to the cell for mechanical support, determining both the shape and the growth direction of the cell. Growth speed in the rapidly expanding tube is therefore related to the mechanics of the cell wall which in turn is determined by the composition and the configuration of its components (Taylor *et al.* 1997; Geitmann and Steer 2006).

In general, two or three layers can be distinguished in pollen tube cell walls (Heslop-Harrison 1987; Steer *et al.* 1989). The outer fibrillar layer is mainly composed of pectins which are secreted at the apex, whereas the inner, secondary layer is callosic and deposited only in the cylindrical shank of the cell (Ferguson *et al.* 1998; Mascarenhas 1993). Pectins are secreted in methyl-esterified form and become increasingly de-esterified in the maturing distal region. This non-uniform distribution of pectin esterification contributes to an increase in the degree of cell wall rigidity and a decrease of visco-elasticity along the longitudinal axis of the cell (Geitmann *et al.* 2004). This mechanical gradient is likely to be responsible for the morphogenesis of the perfectly cylindrical cell (Geitmann and Steer 2006).



While distribution and structural roles of pectins and callose have been investigated in detail, other cell wall components are poorly characterized in pollen tubes. Cellulose, a major component in most plant cell walls, is present in uncharacteristically low amounts in pollen tubes (Schlupmann *et al.* 1994). Depending on the species and method of investigation this polymer has been associated with the outer fibrillar layer (Shivanna *et al.* 1985; Ferguson *et al.* 1998) or the inner callosic layer. In *Nicotiana tabacum* pollen tubes, cellulose has been detected beginning at 5-15  $\mu\text{m}$  behind the growing tip (Ferguson *et al.* 1998). In plant cells in general, cellulose is deposited in extremely ordered layers in an arrangement that allows the cell to grow and expand by water influx (Lloyd 2006). Since the internal pressure caused by water uptake is a non-vectorial force it is the orientation of cellulose microfibrils that determines the direction of expansion and thus the eventual shape of the growing cell (Green 1962; Emons *et al.* 1998; Kerstens *et al.* 2001; Baskin 2005). The spatial arrangement of the cellulose microfibrils, therefore, plays a central role in plant cytomechanics.

Tip-growing cells do not expand in their distal regions. Therefore, the main function of the cell wall in this part of the cell is to provide sufficient tensile resistance to withstand internal turgor pressure. Once the cell wall has become part of the mature, cylindrical region, no expansion in any direction, transverse or longitudinal, is required. In root hairs, another type of tip growing cell, the geometry of the wall texture is helicoidal where the microfibril orientation changes by a constant angle from one lamella to another (Emons *et al.* 1998). These authors developed a theoretical model for the formation of the root hair cell wall (Emons *et al.* 1998; Emons *et al.* 2000). Whether similar principles apply to pollen tubes remains unexplored, since information on the orientation of cellulose microfibrils in this cell type is scarce (O'Kelley *et al.* 1954; Sassen 1964).

Since tensile stress in circumferential direction is the biggest stress generated by the turgor in the pollen tube cell wall, we wanted to investigate whether the orientation of cellulose microfibrils indicates a mechanical contribution of this polymer against this stress. We used scanning electron microscopy to study the structure of the cell wall.

We chose pollen of two different angiosperm species, *Solanum chacoense* and *Lilium orientalis*, to allow us to identify common mechanical principles in pollen tubes that *in planta* are exposed to very different mechanical circumstances. The pistils of these two species differ regarding their mechanical resistance to invasion. In lily, a monocot, the style is hollow (Lord 2000) whereas in *Solanum*, a dicot, the style has a solid core of transmitting tissue. Lily pollen tubes therefore grow through a presumably soft matrix, whereas *Solanum* pollen tubes need to invade the apoplastic space of the transmitting tissue. From previous studies we know that the pollen tube cell wall differs between these two species (Parre *et al.* 2005) thus offering an excellent opportunity to identify general mechanical principles governing growth.

To manipulate the amount and chemical configuration of cellulose in the cell wall of *in vitro* growing pollen tubes we used two approaches. The herbicide (1-cyclohexyl-5-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-1 $\lambda$ 4,2,4,6-thiatriazin-3-amine (CGA 325'615) inhibits the synthesis of crystalline cellulose and promotes the accumulation of its amorphous or non-crystalline form, which lacks hydrogen bonding between glucan sheets, by causing a disruption of rosette architecture (Kurek *et al.* 2002). The enzyme complex cellulase digests cellulose in two steps, and converts crystalline, amorphous, and synthetic celluloses to glucose.

## 2.2 Materials and Methods

### 2.2.1 Plant material

*Solanum chacoense* plants were grown in the greenhouses of the Montreal Botanical Garden, and *Lilium orientalis* pollen was obtained from a local flower shop. Pollen was dehydrated for 24 h and then stored at -80°C for *Lilium orientalis* and at -20°C for *Solanum chacoense*.

### 2.2.2 Pollen culture

Pollen was cultured in liquid growth medium containing 100 mg mL<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300 mg mL<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • H<sub>2</sub>O, 100 mg mL<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 200 mg mL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, and 50 mg mL<sup>-1</sup> sucrose (Brewbaker *et al.* 1963) for *Solanum* pollen and 0.29 mg mL<sup>-1</sup> MES, 0.01 mg mL<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0147 mg mL<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, and 50 mg mL<sup>-1</sup> sucrose for *Lilium* pollen. Approximately 5 mg pollen was added to 4 ml growth medium placed in 25ml Erlenmeyer flasks which were incubated at 25°C under continuous slow shaking. Cellulase (Sigma; 6.3 units/mg; One unit liberates 1.0 µmole of glucose from cellulose in one hour) or CGA 325' 615 (generously provided by Syngenta, Basel, Switzerland) were added from stock solutions (Cellulase: 1 and 10% w/v; CGA: 10 mM in DMSO stored at 4°C) either at the beginning of incubation or at various times after germination.

### 2.2.3 Brightfield observations

Germinated pollen tubes were filtered and subsequently fixed with 3% freshly prepared formaldehyde in Pipes buffer (1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Pipes) for one hour at room temperature. After fixation pollen was mounted on a microscope slide and observed with differential interference contrast optics in a Nikon TE2000 inverted microscope.

#### **2.2.4 Fluorescence label**

For immuno-fluorescence labelling, pollen tubes were filtered and subsequently fixed in 3% freshly prepared formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in Pipes buffer for 30 min. After washing cells were incubated with monoclonal antibodies JIM5 or JIM7 (generously provided by Dr. Paul Knox, University of Leeds, United Kingdom) diluted 1:50 in PBS buffer, followed by incubation with goat anti-rat IgG–Alexa Fluor 594 (diluted 1:100 in buffer; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). JIM5 and JIM7 recognize homogalacturonans with a low and a high degree of esterification, respectively (VandenBosch *et al.* 1989; Knox *et al.* 1990). Pollen tubes were mounted onto glass slides and observed in a fluorescence microscope using a Texas red filter set. Controls were performed by omitting incubation with the primary or the secondary antibody. Decolorized aniline blue and calcofluor white (Fluorescent Brightener 28; Sigma) were used to stain callose and cellulose, respectively, in fixed pollen tubes. After fixation and two washes in buffer, cells were incubated for 15 min with the staining agent (1 mg.mL<sup>-1</sup> aniline blue in 0.15 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mg mL<sup>-1</sup> calcofluor white in double-distilled H<sub>2</sub>O), mounted immediately and observed under UV light excitation.

#### **2.2.5 Fluorescence microscopy**

Specimens labelled for cell wall components were observed in a fluorescence microscope (Nikon TE2000) equipped with a Roper FX cooled CCD camera. Images were acquired with ImagePro software (Media Cybernetics).

Exposure times of images that had to be compared for fluorescence intensity were identical. These pictures were not corrected for brightness or contrast.

### **2.2.6 Scanning Electron Microscopy**

Samples for scanning electron microscopy were taken at 3h after germination for *Lilium orientalis* and at 4h for *Solanum chacoense* and fixed in 3% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in Pipes buffer for 24h. After washes, samples were subjected to digestion by a set of enzyme combinations overnight and under continuous shaking. Pectinase and cellulase concentrations were 1500 mg mL<sup>-1</sup> and lyticase was added at 1 mg mL<sup>-1</sup>. Pollen was dehydrated through a graded series of ethanol to 100% and then samples were critical point dried before being mounted and double coated with gold and palladium. Observations were performed with Jeol JSM 35 scanning electron microscope operated between 10 and 15 kV.

## 2.3 Results

### 2.3.1 The net orientation of cellulose microfibrils is not transverse

To characterize the structure of the pollen tube cell wall we observed fixed cells in the scanning electron microscope. The surface of the lily pollen tube appeared to be patterned with small wrinkles in arbitrary orientation (Fig. 1A). These are likely to represent the pectin layer, which generally composes the outermost layer of the pollen tube cell wall. These structures disappeared in samples treated with pectinase and lyticase following chemical fixation. This treatment exposed fibrous structures which are likely to represent cellulose microfibrils. The main orientation of these fibers corresponded to a helical arrangement with a pitch of  $25^\circ$  to the longitudinal axis of the cell (Figs.1B-D).

*Solanum* pollen tubes have a rather smooth surface with randomly oriented irregularities (Fig. 2A). Treatment with pectinase alone (Fig.2C) and more dramatically with a combination of pectinase and lyticase (Fig.2B) revealed grooves oriented parallel to the longitudinal axis of the cell. While microfibrils could not be identified as such, the orientation of the grooves (and therefore instable regions of the cell wall) is likely to be parallel to the net microfibril orientation.

### 2.3.2 Cellulase affects pollen tube germination and growth differently in *Lilium* and *Solanum*

In order to germinate, the cell wall at the pollen grain aperture needs to yield to the pressure generated by water uptake into the hydrating cell. The same mechanical principle applies to pollen tube growth during which the apical cell wall needs to yield continuously. While giving way to the pressure, at the same time the wall must not rupture under the internal pressure. Precise control of the tensile resistance in the cell wall to the internal pressure is

therefore essential. If cellulose was involved in the tensile resistance withstanding the force exerted on the aperture cell wall by the increase in volume, its partial digestion should facilitate germination whereas its complete digestion might cause bursting. To test this we complemented the germination medium with various concentrations of cellulase and quantified the germination rate after 2h. At enzyme concentrations between 0.1% and 0.6%, the germination rate was not significantly altered in either species (data not shown).

To assess the effect of cellulase on pollen tube growth we quantified the length of pollen tubes formed in the presence of the enzyme at 2h after germination. In *Lilium* 0.1% cellulase caused an increase in the length of pollen tubes whereas higher enzyme concentrations resulted in a decrease (Fig. 3). At 0.5%, 90% of *Lilium* tubes had burst. Growth of *Solanum* pollen tubes was affected differently as no stimulation was observed at the concentrations tested. Pollen tube length was reduced slightly at 0.5 and 0.6% (Fig. 3). Bursting occurred only at 1% of cellulase.

### **2.3.3 Cellulose is implicated in determining the pollen tube diameter**

Turgor pressure is a non-vectorial force and therefore acts not only on the cell wall in the growing tip but also on the mature portions forming the cylindrical shank. We wanted to test whether cellulose is involved in resisting the tensile stress generated by the turgor pressure in the cylindrical part of the pollen tube. To this end we measured the diameter of pollen tubes grown in the presence of cellulase.

For consistency, the diameter was always measured in the region 20-30  $\mu\text{m}$  from the tip. Measurements were taken 2 (*Lilium*) or 4 hours (*Solanum*) after germination. In both species the presence of the enzyme resulted in formation of pollen tubes with increased diameter. In *Lilium*, this effect was visible at 0.2% cellulase whereas in *Solanum* only concentrations above 0.5% were effective (Fig. 4). Higher concentrations were not assessed since the percentage of burst pollen tubes or grains became significant (n=50 pollen tubes, experiments were repeated three times).

#### **2.3.4 The effects of cellulase addition on pre-germinated pollen tubes**

When inhibitors or enzymes are administered starting prior to germination, the pollen tube has time to adapt to the situation from the time of germination. Therefore, we wanted to assess how tubes germinated under control conditions would react to the addition of cellulase. We used the enzyme concentration that resulted in increased pollen tube length when applied prior to germination (0.1%) and administered it to pre-germinated *Lilium* pollen tubes at 3h after germination. Pollen tubes were subsequently incubated for another 2h. In 80% of the tubes, the time point of enzyme addition was marked by a local swelling from which a new tubular outgrowth had been formed (Figs. 5-8). In most cases the outgrowth occurred at an angle of up to 90° to the initial direction of growth. In many cases the outgrowth formed slightly behind the apical swelling (Figs. 8 A, B). The new outgrowths proceeded seemingly undisturbed by the continuous presence of the enzyme producing a cylindrical cell of the same or slightly smaller diameter than that of the original tube. The diameter of the tube portion grown during pre-germination was not altered significantly by the enzyme treatment ( $18.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$  whereas control tubes measured  $18 \pm 40 \mu\text{m}$ ).

For *Solanum chacoense*, no growth stimulating cellulase concentration had been established. We applied 1.5% to pre-germinated tubes, since lower concentrations did not



cause any visible effect. Addition of 1.5% cellulase or higher concentrations caused *Solanum* pollen tubes to exhibit similar phenomena as *Lilium* pollen tubes treated with 0.1% cellulase. The time points of enzyme additions were marked by local swellings and new outgrowths which frequently originated at angles up to 90° from the original growth direction (Fig. 9). In addition, we observed numerous cells that were not able to form a new outgrowth but continued growing with a large diameter thus forming a bulbous shape at their apex (Fig. 10). In these cells, the length of the tube portions formed during the 2h period following enzyme addition was very limited indicating that growth proceeded extremely slowly or arrested completely.

### **2.3.5 Cellulase treatment leads to an overproduction of other cell wall components**

The formation of new outgrowths that proceeded to grow in an undisturbed manner with regular cylindrical morphology despite the presence of cellulase led us to hypothesize that the pollen tube must somehow compensate for the lack of cellulose. Therefore, we used fluorescence label to investigate the composition of the cell wall in the parts of the pollen tube formed before and after enzyme addition. As expected, label for cellulose in cellulase treated cells was weak in the older parts of the tube and even more so in the outgrowths formed after addition of the enzyme (Fig. 7). The exacerbated effect in the outgrowth could be due to the enzyme activity being more effective in the newly formed tube as the enzyme has easier access within a thinner wall.

Astonishingly, label for callose was less intense in the new outgrowth than in the older tube even though the length of the outgrowth was long enough to expect significant callose deposition at least in its distal region (Fig. 8). Remarkably, however, pectin label showed a significant increase in fluorescence intensity in parts grown after the onset of cellulase

treatment (Fig. 5 and Fig. 6). Pectin label intensity was also significantly higher compared with control tubes grown in the presence of the cellulase disactivated by boiling.

### **2.3.6 Inhibition of cellulose crystal formation affects pollen tube cell wall mechanics**

Formation of crystalline cellulose has an important effect on the mechanical properties of cellulose. In order to demonstrate that this effect is essential for the mechanics of pollen tube growth, we assessed the effect of the inhibitor of cellulose crystallization CGA. The presence of the drug during pollen germination and growth resulted in the formation of tubes with an increased diameter (Figs. 11, 12) but did not affect the average length of the cells (data not shown). In *Solanum* pollen tubes this effect was particularly prominent at 100 nM (Fig. 11), whereas in *Lilium* the biggest diameter was observed at 100  $\mu$ M (Fig.12). Whereas at 100  $\mu$ M all *Solanum chacoense* pollen tubes burst soon after germination, *Lilium orientalis* tubes resisted much higher concentrations of CGA and only burst at 10 mM CGA.

To determine the effect of CGA on pre-germinated pollen tubes, lily pollen germinated under normal conditions for 2h were treated with two different concentrations (50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M) of the inhibitor. At 50  $\mu$ M, the cells changed their growth direction and showed irregularities in the tube diameter (Fig.13 A and B). At 100  $\mu$ M, pollen tube growth was inhibited and apical swelling occurred. However, the growth arrest was reversible. After rinsing with growth medium lacking the inhibitor, growth was re-established albeit with reduced rates (data not shown).

## 2.4 Figures

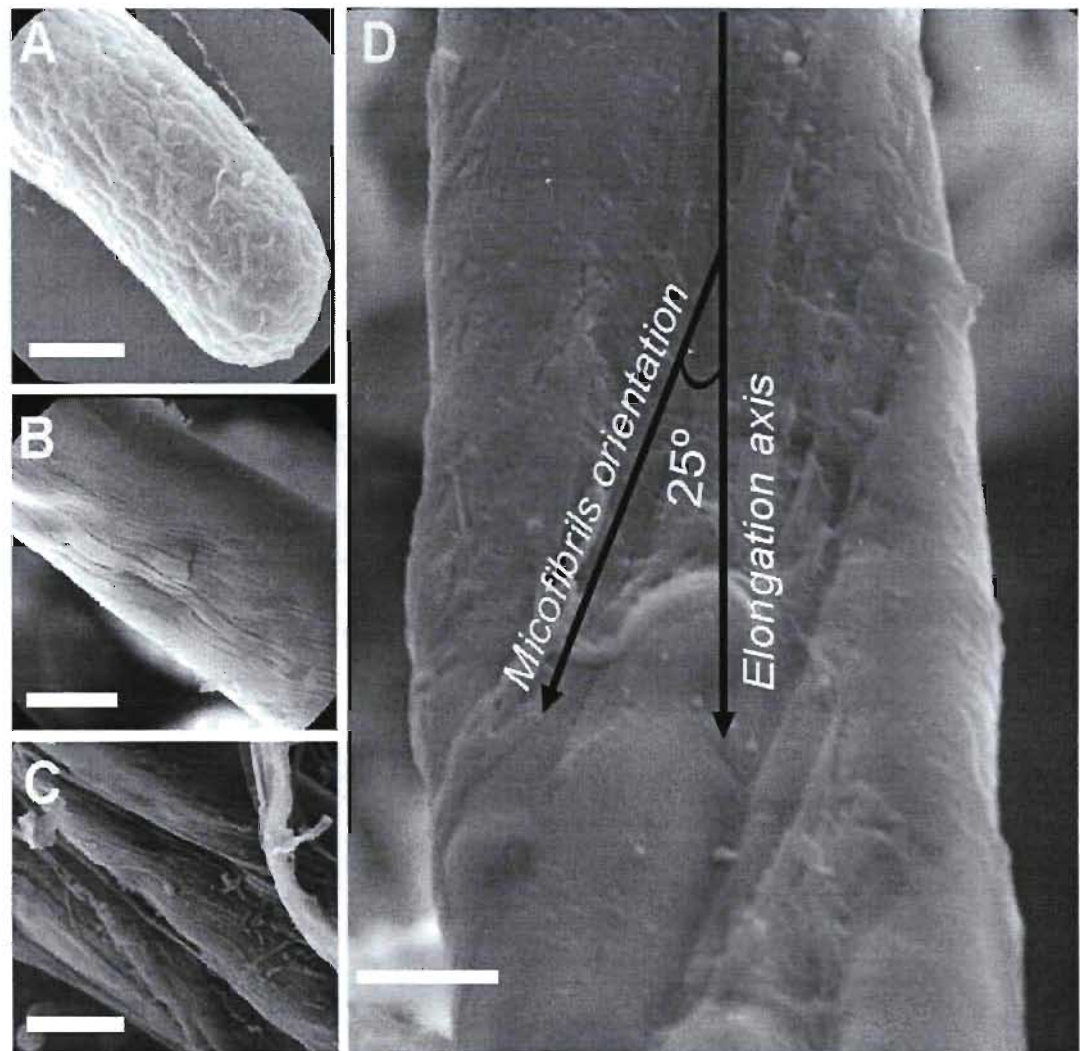


Figure 1. Scanning electron micrographs of chemically fixed *Lilium orientalis* tubes treated with pectinase and lyticase. A shows the apex of an untreated control tube. B, C and D show the external layer of microfibrils and their helical orientation with a pitch of 25° to the longitudinal axis of growth. Bars = 8  $\mu\text{m}$  (A, B and C), 4,5  $\mu\text{m}$  (D)

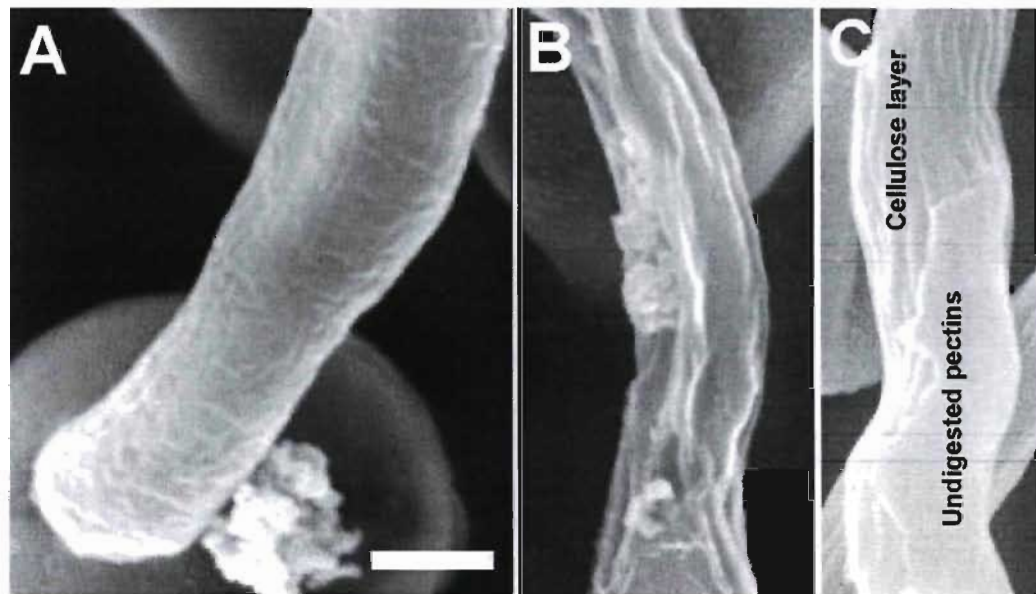


Figure 2. Scanning electron micrographs of chemically fixed *Solanum chacoense* tubes treated with a combination of enzymatic digestions. Control pollen in A. Pectinase and lyticase digestion in B. C shows a pectinase treated tube where the putative layer of cellulose is partially exposed. Bar = 7  $\mu\text{m}$ .

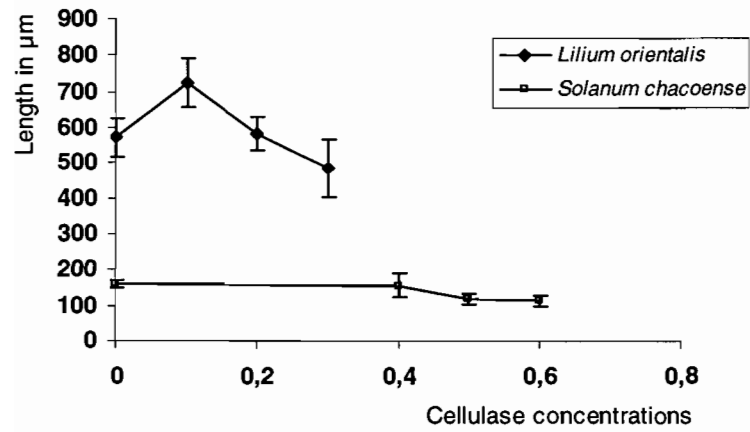


Figure 3. Effect of cellulase on pollen tube length measured 2h after germination for *Lilium* and 4h for *Solanum*.

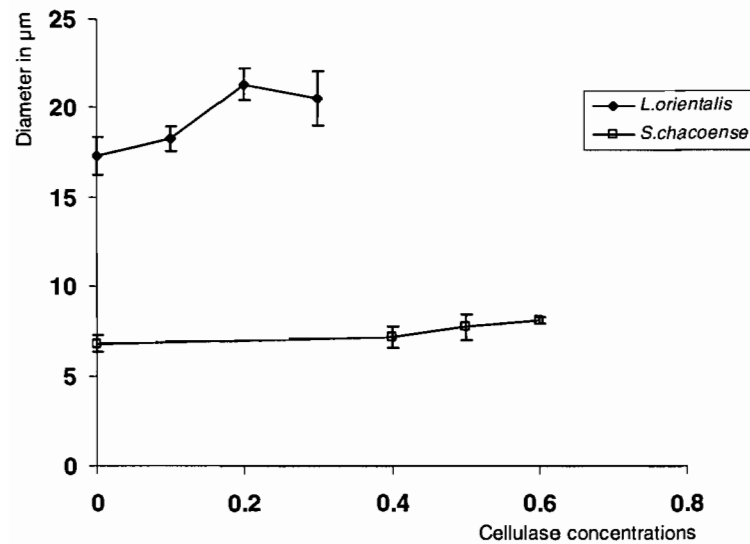


Figure 4. Effect of cellulase on pollen tube diameter measured 2h after germination for *Lilium* and 4h for *Solanum*.

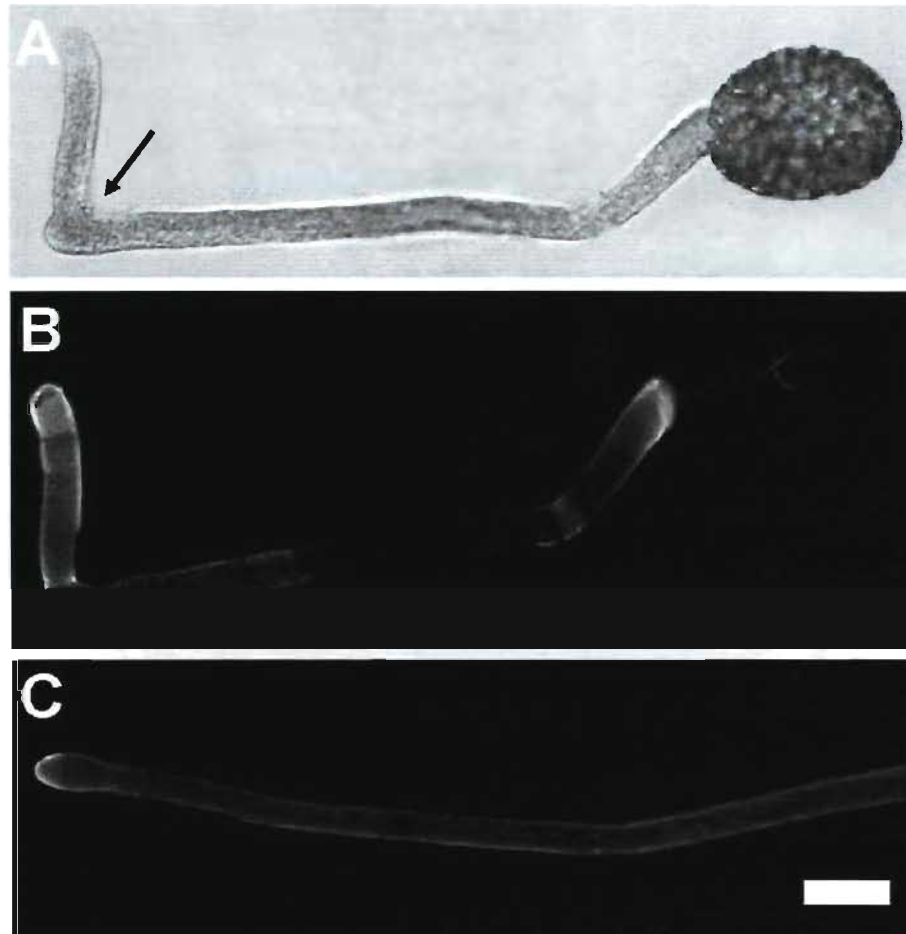


Figure 5. Fluorescence label with monoclonal antibody J1M7 for methyl-esterified pectins in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase (A, B) or boiled enzyme (C) resulting in outgrowth in new direction (A, B). The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Bar = 25  $\mu$ m

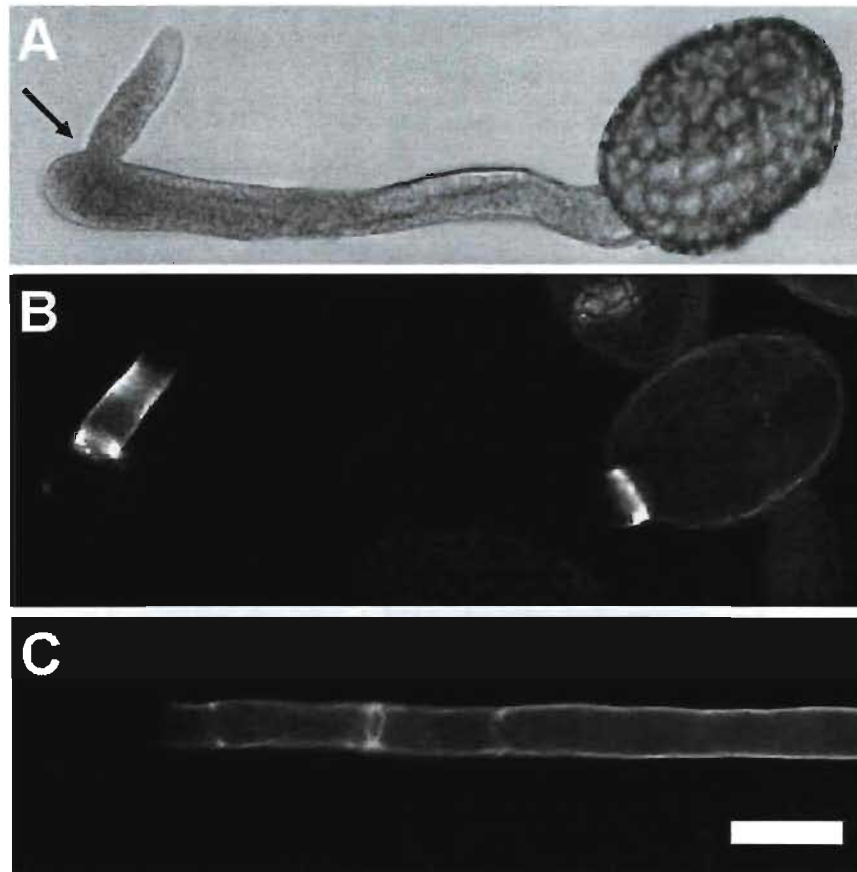


Figure 6. Fluorescence label with monoclonal antibody JIM5 for unesterified pectins in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase (A, B) or boiled enzyme (C) resulting in outgrowth in new direction (A, B). The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Bar = 30  $\mu$ m

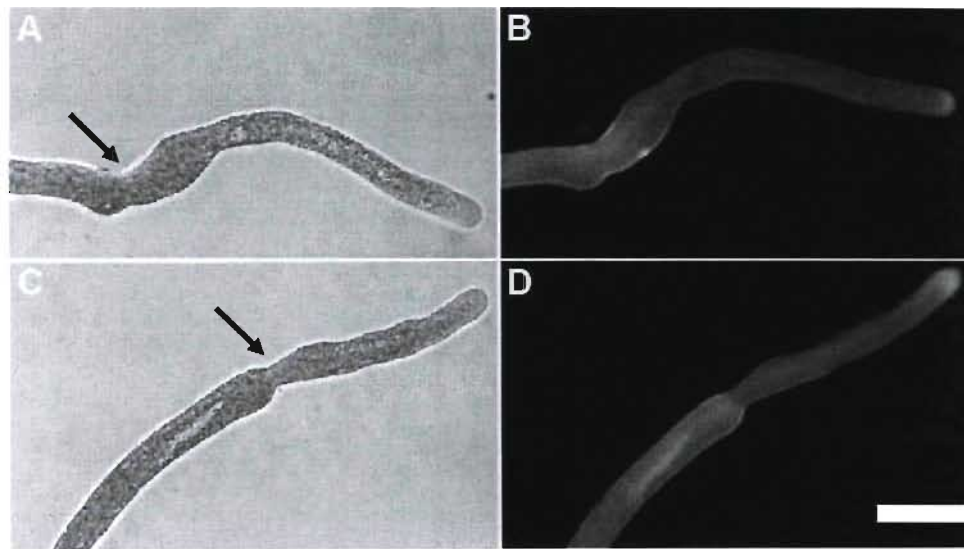


Figure 7. Fluorescence label with calcofluor white for cellulose in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase resulting in a swelling and new outgrowth. The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Cellulose label decreases in tube portions grown after cellulase application (marked by black arrows). Bar  $\approx 35 \mu\text{m}$ .

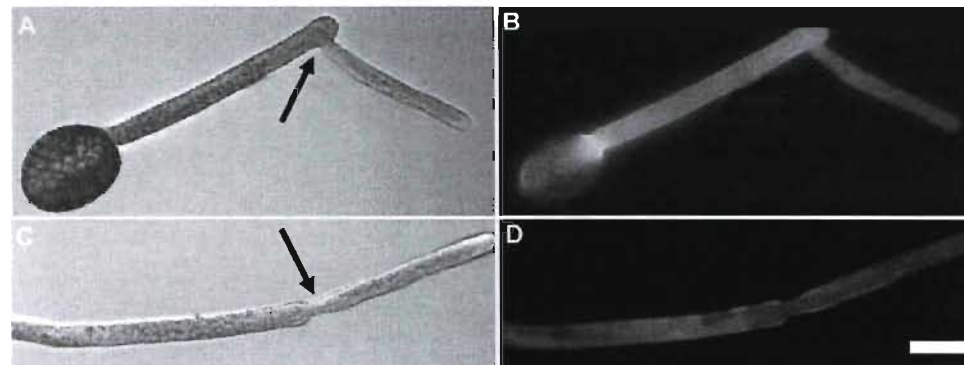


Figure 8. Fluorescence label with aniline blue for callose in *Lilium orientalis* pollen tubes. Pre-germinated pollen tubes were treated with 0.1% cellulase resulting in a swelling and new outgrowth. The arrow indicates the length of the pollen tube at the time of application of the enzyme. Callose label is very weak in the portions grown after enzyme addition. Bar  $\approx 30 \mu\text{m}$ .



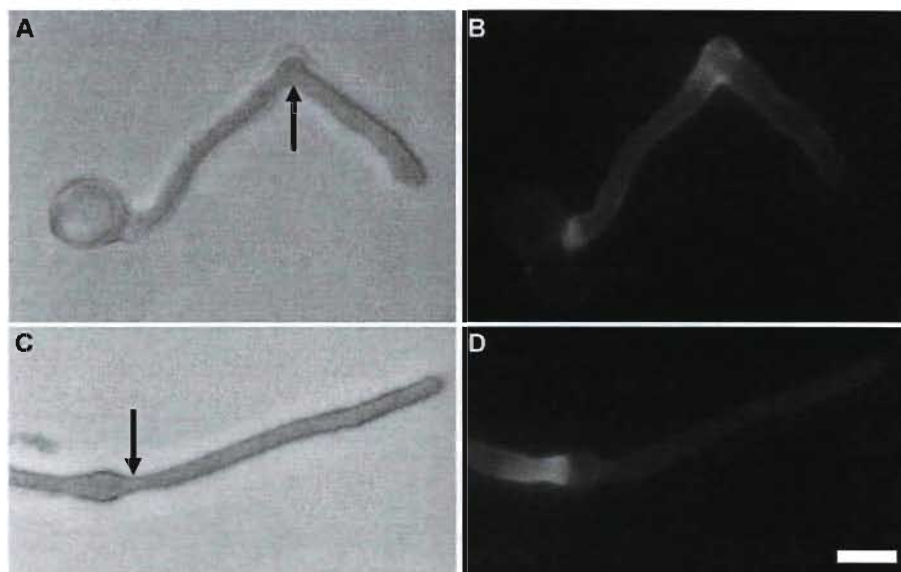


Figure 9. Treatment of pre-germinated *Solanum chacoense* tubes with 1.5% cellulase. Arrows in DIC images indicate time point of treatment (A, C) Fluorescence label with calcofluor white for cellulose (B, D) is very weak in the newly formed portions of the tube. Bar = 16  $\mu\text{m}$ .

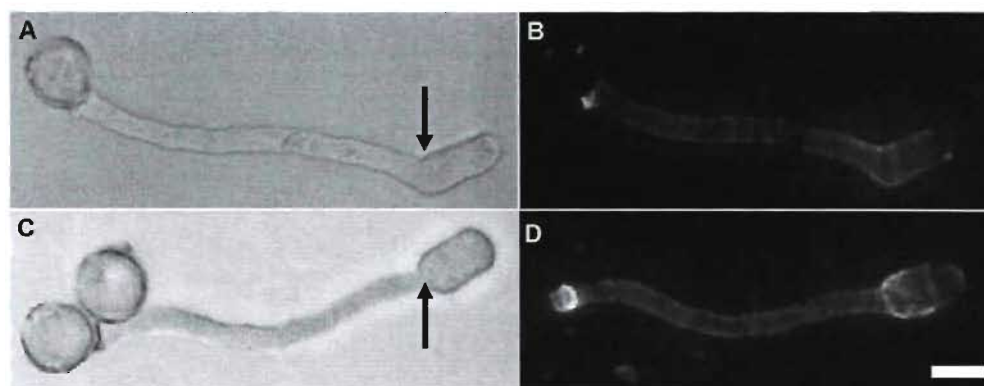


Figure 10. Treatment of pre-germinated *Solanum chacoense* tubes with 1.5% cellulase. Arrows in DIC images indicate time point of treatment (A, C) Fluorescence label with JIM5 for acidic pectins (B, D) shows a normal labelling such as in control tubes. Bar = 16  $\mu\text{m}$ .

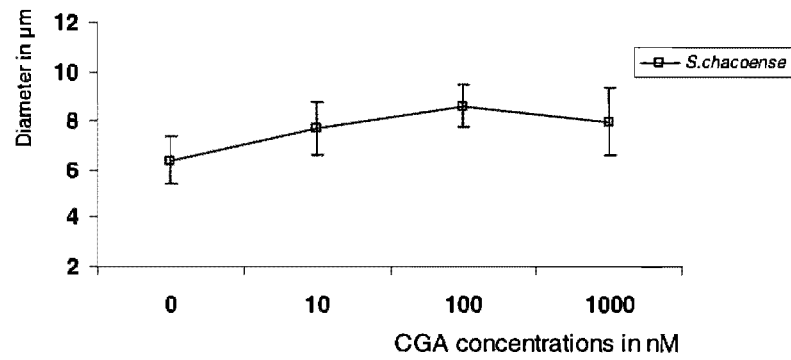


Figure 11. Effect of CGA on the diameter of *Solanum chacoense* pollen tubes germinated in the presence of the agent.

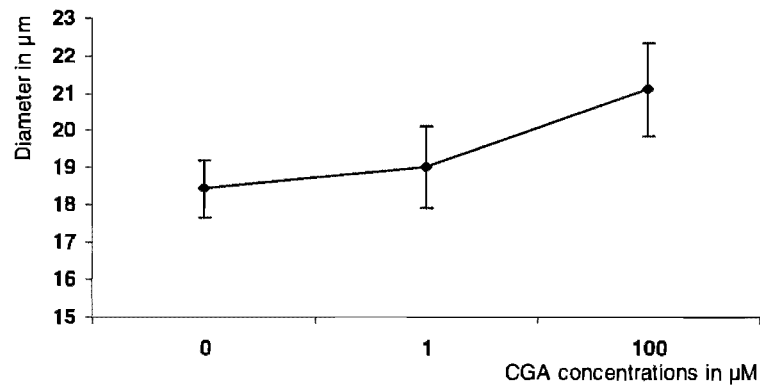


Figure 12. Effect of CGA on the diameter of *Lilium orientalis* pollen tubes germinated in the presence of the agent.

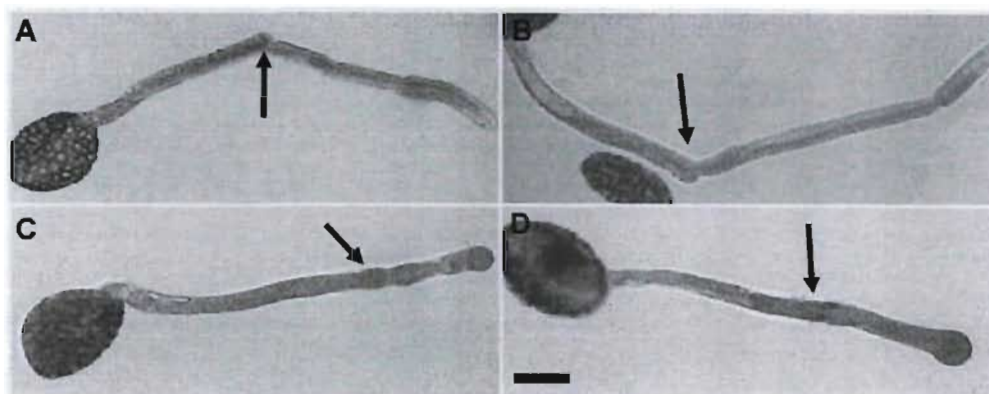


Figure 13. Phenotypes of pre-germinated *Lilium* tubes treated with 50  $\mu$ M CGA (A and B) and 100  $\mu$ M CGA (C and D). Arrows indicate the time of administration. Bar = 17  $\mu$ m.

## 2.5 Discussion

### 2.5.1 Cellulose plays a role in pollen tube cell wall mechanics

Plant cell walls provide structure to the cell they surround. Depending on the chemical composition they have the ability to resist tensile and compressive stresses thus ensuring structural and mechanical support. By determining not only the shape but also the growth direction of the cell, the wall plays a key role in plant development and survival (McCann *et al.* 1991). Because of their high tensile resistance, cellulose microfibrils play a crucial role in the architecture of the cell wall. In the tip growing pollen tube, the abundance of cellulose is unusually low compared to other cells with primary walls (Schlöpmann *et al.* 1994). Nevertheless, interfering with cellulose synthesis affects pollen tube growth. Inhibitors such as 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB), an effective and specific inhibitor of cellulose synthesis, cause pollen tubes of *Lilium auratum* and *Petunia hybrida* to rupture or assume a distorted-bulbous shape (Anderson *et al.* 2002). Disrupting cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes resulting in a reduction in growth (Lazzaro *et al.* 2003). Our results with cellulase and CGA are consistent with these data. Tubes burst upon addition of high concentrations of these agents, indicating that digesting cellulose or preventing its crystal formation destabilizes the cell wall sufficiently to give way to the turgor pressure and rupture.

### 2.5.2 Pollen tube sensibility to drugs and enzymes differs between *Lilium* and *Solanum*

Comparison of the data obtained for *Lilium* and *Solanum* pollen tubes reveals that pollen from the two species has different sensitivities towards cellulase and CGA. While the germination rate is unaffected by these agents, pollen tube length at 2 hours is increased in lily pollen tubes in the presence of optimal concentrations of cellulase. This might in part be

due to a mechanical facilitation of germination due to a softening of the cell wall at the aperture. The absence of this effect in *Solanum* is consistent with the fact that no visible cellulose depositions are present in the aperture of the *Solanum* pollen grain, whereas cellulose label is intense at the aperture of the lily pollen grain (Parre *et al.* 2005).

Pollen tubes of both species are affected by the presence of cellulase in the growth medium. The cellular diameter was increased in both species, but in lily the effect was achieved at lower concentrations. This indicates that cellulose plays a role in resisting against the tensile stress induced in the cell wall by the internal turgor pressure. The effect of the enzyme on *Solanum* pollen tubes was rather small, however, thus indicating that in this species resistance against circumferential tension stress does not rely to a great degree on the presence of cellulose. It was therefore surprising to note that CGA had a much more pronounced effect in *Solanum* than in *Lilium* pollen tubes causing an increase of tube diameter by approximately 30% at concentrations that were ineffective in *Lilium* pollen tubes. Nevertheless, *Lilium* pollen tubes were not immune against the effect of the inhibitor as their diameter was affected at higher concentrations of the agent.

These data confirm that despite its low abundance and differences between species, cellulose in its crystalline form is required to establish a mechanical resistance against circumferential tension stress in the pollen tube cell wall. Differences in sensitivity between the two species could be explained by different amounts of cellulose within their walls, different accessibility to the enzyme and different sensibility to the inhibitor.

### **2.5.3 Growing pollen tubes can compensate for the lack of cellulose with the production of pectin**

Pollen tubes were able to resume growth after undergoing a transient arrest upon addition of moderate concentrations of cellulase. To our surprise, even in the continuous presence of the enzyme, the new outgrowth generally had a diameter similar to that of the older part of the cell. Reduced label for cellulose in the newly formed tube confirms that the enzyme remains active, however. This means that the cell is able to perceive the lack of cellulose and to compensate for it by overproducing another cell wall component with tensile stress resistance capacity. Immunolabeling revealed that this compensation was achieved by overproducing pectins. This astonishing ability of plant cells to regulate their mechanical properties despite the lack of an essential building component has been shown previously in other systems. Primary cell walls of *Korrigan*, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4- $\beta$ -glucanase, show an increase in homogalacturonan epitopes and a decrease in cellobiohydrolase I-gold labelling (His *et al.* 2001). Likewise, suspended tomato cells grown on 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB) a cellulose synthesis inhibitor, can divide and expand despite the absence of a cellulose-xyloglucan network (Delmer 1987; Delmer *et al.* 1987).

Tomato cells that contain markedly reduced levels of cellulose show a significant enrichment in pectic polymers and reduced levels of xyloglucan in their cell wall extractions (Shedletzky *et al.* 1992). This shows that plant cells possess the flexibility to tolerate alterations in cell wall composition (Shedletzky *et al.* 1990) and to compensate for the lack of one component with the overproduction of another. Our data confirm that this principle is true even in rapidly elongating cells such as pollen tubes. This raises the question how a plant cell perceives the lack of one particular component, or, more generally, the lack of mechanical stability. It is also unclear, how pectin synthesis and deposition are upregulated subsequently. Enhanced synthesis of pectins seems to be effective in re-establishing the

relationship between cell wall and turgor since the cellular diameter remains almost unaltered and the newly formed tube is perfectly cylindrical.

#### **2.5.4 Microfibril orientation and the mechanics of cellular growth**

In cells growing diffusely, the orientation of cellulose microfibrils determines the direction of cell expansion (Baskin *et al.* 1999; Sugimoto *et al.* 2000) since it determines mechanical anisotropy in the cell walls (Burk *et al.* 2002; Suslov *et al.* 2006). Since cellulose microfibrils are highly resistant to tensile stress, cellular expansion takes place in the direction perpendicular to the net orientation of microfibrils, which therefore control cellular morphogenesis (Green 1962). In pollen tubes, cell wall expansion only takes place in the apex. The distal, mature region needs to be stabilized against the tensile stress generated by the turgor pressure but there is no need for a mechanism of controlled yielding in this region. Callose is likely to be responsible in part for this stabilizing function (Parre *et al.* 2005), but cellulose might play a role as well as suggested by the enzyme and inhibitor effects on cellular diameter.

The most efficient orientation of cellulose microfibrils for reinforcing the cell wall against circumferential tensile stress would be an orientation perpendicular to the long axis ( $90^\circ$ ).

In *Petunia* pollen tubes, the microfibrils are oriented with a preferential angle of between  $+45^\circ$  and  $-45^\circ$  is observed in the distal part (Sassen 1964; Derksen *et al.* 1999). Our studies show that *in vitro* grown lily pollen tubes have microfibrils oriented at an angle of  $25^\circ$  to the long axis. As this observation derives from specimens observed in the scanning electron microscope after enzymatic digestion of matrix components, this value is true for the angle of the outermost microfibrils only. If there are inner layers, they might have a different angles as suggested for root hairs (Emons *et al.* 1998). Nevertheless, the data clearly indicate that the microfibril angle is very different from the theoretically optimal value of  $90^\circ$ . The same is true for pollen tubes from *Solanum*, in which the appearance of longitudinal grooves upon matrix degeneration indicated a net orientation of microfibrils parallel to the long axis.

Therefore, it is unlikely, that cellulose plays an important mechanical role in the distal, cylindrical part of the pollen tube. This is consistent with the finding that the parts of the tube that grow prior to cellulase treatment do not undergo an increase in diameter even though cellulose is at least partly digested.

### **2.5.5 The pollen tube diameter is determined in the subapical region**

Even though cellulase has an effect on the pollen tube diameter when the enzyme is present from the beginning of germination, the diameter of the existing regions of pre-germinated pollen tubes is not altered when the enzyme is applied at a later time. Also, bursting events always take place at or close to the apex of the cell.

This indicates that the distal part of the tube albeit possessing cellulose, does not rely on it for reinforcement against circumferential tensile stress. The mechanical reinforcement is likely to be provided by callose in this region (Parre *et al.* 2005).

The situation is different in the subapical region adjacent to the tip where callose is absent. Here the growing cell wall is subject to continuously changing stresses and strain rates due to the shape change from approximately hemispherical to cylindrical, as can be calculated applying the laws of thin pressure vessels and is observed experimentally (Dumais *et al.* 2004; Geitmann and Steer 2006). A section of cell wall surface that moves from the apex to the cylinder experiences increasing stress in circumferential direction reaching a maximum upon becoming part of the cylinder. At the same time, compared to the rest of the cylinder where increasing cellulose and later callose deposition occurs, this initial cylinder region is the least stable. A disturbance of cellulose abundance (cellulase) or structure (CGA) therefore changes the resistance to stress in this area and consequently affects cellular diameter. This can thus lead to the irregular diameter or swelling observed under the influence of high concentrations of CGA.



The reason why expansion growth can occur at the growing apex of a pollen tube despite the geometry-induced lower tensile stress in this region is the high degree of cell wall deformability in this region. A transient arrest of growth induced by treatment with moderate concentrations of enzyme or inhibitor will probably allow the apical cell wall to rigidify (due to ongoing pectin de-esterification and gelation). As a consequence, a new outgrowth will not form from the apex but from the transition region between apex and shank as the circumferential tensile stress is higher here.

## 2.6 Conclusions

Taken together the results presented here indicate that cellulose is not indispensable for the stabilization of the mature, cylindrical region of the pollen tube. Neither the localization of bursting events, nor the effect of cellulose digestion or the orientation of microfibrils is consistent with a crucial role for microfibrils in the mechanics of this part of the cell. This is supported by the finding that callose production is not increased upon enzymatic digestion of cellulose. The available callose seems to be sufficient to resist tensile stress. Similar observations were made for treatment with DCB (Anderson *et al.* 2002). Callose production is known to depend on the mechanical requirements for tensile stress resistance (Parre *et al.* 2005) and our results allow us to re-emphasize the importance of this "amorphous" cell wall component for pollen tube mechanics.

The situation is different in the subapical region, however. Here, an increased deposition of pectin is triggered upon the artificial reduction in the amount of cellulose. Prior to the onset of this compensatory mechanism and the formation of a new outgrowth, the subapical region of the pollen tube is strongly affected by the agents interfering with cellulose mechanics as shown by swellings and irregular growth. As callose is not present in this subapical region, cellulose microfibrils might actually play an important mechanical role here. Cellulose could thus be involved in determining the diameter of the growing cell. This is an important function as the diameter of pollen tubes likely needs to be optimized within a range that is determined by the following constraints: *i)* a minimum diameter needs to be maintained to allow the male germ unit to pass through the tube and *ii)* the smaller the cellular diameter, the easier it is for the tube to penetrate the transmitting tissue.

The latter is based on fracture theory which states that the smaller the width of a crack, the bigger is the stress on the material that enables the propagation of the crack. In addition, a smaller tube will have a smaller surface on which friction with the surrounding surface occurs thus reducing the amount of mechanical work associated with invasive growth.

To better understand this putative mechanical function of cellulose in the subapical region of growing pollen tubes, it will be essential to identify the orientation of microfibrils in this part of the cell, an approach that requires the development of new experimental protocols. It would be important to localize cellulose synthases and to find out whether they are actually actively producing cellulose as close to the tip as is suggested by the presented data. Also, the analysis of mutants affecting cellulose synthase functioning might be promising in this context.

## 2.7 References

- Anderson, J. R., W. S. Barnes and P. Bedinger (2002). "2,6-dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes." Journal of Plant Physiology **159**(1): 61-67.
- Baskin, T. I. (2005). "Anisotropic expansion of the plant cell wall." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**: 203-222.
- Baskin, T. I., H. T. H. M. Meekes, B. M. Liang and R. E. Sharp (1999). "Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils." Plant Physiology **119**(2): 681-692.
- Brewbaker, J. and B. Kwack (1963). "The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. ." American Journal of Botany **50**: 859-865.
- Burk, D. H. and Z.-H. Ye (2002). "Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein." Plant Cell **14**(9): 2145-2160.
- Delmer, D. P. (1987). "Cellulose biosynthesis." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **38**: 259-290.
- Delmer, D. P., S. M. Read and G. Cooper (1987). "Identification of a receptor protein in cotton fibers for the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile." Plant Physiology **84**(2): 415-420.
- Derksen, J., A. Van Amstel, A. Rutten, A. Knuiman, Y. Li and E. Pierson (1999). "Pollen tubes: cellular organization and control of growth." In: Clément C, Pacini E, Audran J-C (eds) Anther and pollen. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo:119-133.
- Dumais, J., S. R. Long and S. L. Shaw (2004). "The mechanics of surface expansion anisotropy in *Medicago truncatula* root hairs." Plant Physiology **136**(2): 3266-3275.

- Emons, A. M. and B. M. Mulder (2000). "How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture." Trends Plant Science **5**(1): 35-40.
- Emons, A. M. C. and B. M. Mulder (1998). "The making of the architecture of the plant cell wall: How cells exploit geometry." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(12): 7215-7219.
- Ferguson, C., T. T. Teeri, M. Siika-aho, S. M. Read and A. Bacic (1998). "Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*." Planta **206**(3): 452-460.
- Geitmann, A. and E. Parre (2004). "The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements." Sexual Plant Reproduction **17**(1): 9-16.
- Geitmann, A. and M. Steer (2006). "The architecture and properties of the pollen tube cell wall." Plant Cell Monographs **3**: 177-200.
- Green, P. B. (1962). "Mechanism for plant cellular morphogenesis." Science **138**: 1404-1405.
- Heslop-Harrison, J. (1987). "Pollen germination and pollen-tube growth." International Review of Cytology **107**: 1-78.
- His, I., A. Driouich, F. Nicol, A. Jauneau and H. Höfte (2001). "Altered pectin composition in primary cell walls of *korrigan*, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase." Planta **212**(3): 348-358.
- Kerstens, S., W. F. Decraemer and J. P. Verbelen (2001). "Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials." Plant Physiology **127**(2): 381-385.
- Knox, J. P., P. J. Linstead, J. King, C. Cooper and K. Roberts (1990). "Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices." Planta **181**(4): 512-521.
- Kurek, I., Y. Kawagoe, D. Jacob-Wilk, M. Doblin and D. Delmer (2002). "Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-

- binding domains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(17): 11109-11114.
- Lazzaro, M. D., J. M. Donohue and F. M. Soodavar (2003). "Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes." Protoplasma **220**(3 - 4): 201.
- Lloyd, C. (2006). "Microtubules make tracks for cellulose." Science **312**(5779): 1482-1483.
- Lord, E. (2000). "Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme." Trends in Plant Science **5**(9): 368-373.
- Mascarenhas, J. P. (1993). "Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation." Plant Cell **5**: 1303-1314.
- McCann, M. and K. Roberts (1991). "Architecture of the primary cell wall. In: CW Lloyd (ed) The cytoskeletal basis of plant growth and form." Academic Press, London, : 109-129.
- O'Kelley, J. C. and P. H. Carr (1954). "An electron micrographic study of the cell walls of elongating cotton fibers, root hairs, and pollen tubes." American Journal of Botany **41**: 261.
- Parre, E. and A. Geitmann (2005). "More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes." Plant Physiology **137**(1): 274-286.
- Sassen, M. M. A. (1964). "Fine structure of *Petunia* pollen grain and pollen tube." Acta Botanica Neerlandica **13**: 174-181.
- Schlüpmann, H., A. Bacic and S. M. Read (1994). "Uridine-diphosphate glucose-metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana-Alata* Link et Otto." Plant Physiology **105**(2): 659-670.
- Shedletzky, E., M. Shmuel, D. P. Delmer and D. T. A. Lampion (1990). "Adaptation and growth of tomato cells on the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile leads to production of unique cell-walls virtually lacking a cellulose-xyloglucan network." Plant Physiology **94**(3): 980-987.

- Shedletzky, E., M. Shmuel, T. Trainin, S. Kalman and D. Delmer (1992). "Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile : A comparison between two dicotyledonous plants and a graminaceous monocot." Plant Physiology **100**(1): 120-130.
- Shivanna, K. and B. Johri (1985). "The angiosperm pollen." Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Steer, M. W. and J. M. Steer (1989). "Pollen-tube tip growth." New Phytologist **111**(3): 323-358.
- Sugimoto, K., R. E. Williamson and G. Wasteneys (2000). "New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*." Plant Physiology **124**: 1493–1506.
- Suslov, D. and J. P. Verbelen (2006). "Cellulose orientation determines mechanical anisotropy in onion epidermis cell walls." Journal of Experimental Botany **57**(10): 2183-2192.
- Taylor, L. P. and P. K. Hepler (1997). "Pollen germination and tube growth." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 461-491.
- VandenBosch, K. A., D. J. Bradley, J. P. Knox, S. Perotto, G. W. Butcher and N. J. Brewin (1989). "Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots." European Molecular Biology Organization **8**: 335–342.

## ***Chapitre III : Rôle du fucose des chaînes latérales des xyloglucanes dans la croissance des tubes polliniques***

### **3.1 Introduction**

Les xyloglucanes sont les hémicelluloses les plus abondants de la matrice des parois cellulaires végétales chez les dicotylédones. Tout comme les pectines, les molécules de xyloglucane sont en immédiate proximité avec les microfibrilles de cellulose. Microfibrilles et xyloglucanes se connectent via des liaisons hydrogène afin de former un réseau cellulose/hémicellulose (Passioura *et al.* 1992). Cette connection permet de limiter l'agrégation des microfibrilles tout en assurant leur raccordement au sein d'un réseau. Les xyloglucanes semblent également former de liaisons covalentes avec les pectines (Keegstra *et al.* 1973). On rapporte l'existence de ces liaisons entre xyloglucanes et polysaccharides acides dans la paroi primaire de cellules en culture et chez divers angiospermes tels que *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Hordeum vulgare* L., *Spinacia oleracea* L. et *Zea mays* L. (Popper *et al.* 2005).

Lors de la croissance, le réseau cellulose/xyloglucanes joue un rôle de support qu'on qualifie de porte-charge ou "load-bearing" (Whitney *et al.* 1999; Cosgrove 2000). La connection entre les xyloglucanes, ayant à l'origine une conformation torsadée (Fig. 1), et les microfibrilles parfaitement linéaires imposent l'adoption d'une conformation plus ou moins linéaire par les xyloglucanes. La surface de cette conformation doit être complémentaire à celle des microfibrilles de cellulose.



La modélisation informatique a montré que l'association est plus favorable pour les xyloglucanes ayant des groupes de fucose dans leurs chaînes latérales que pour ceux qui n'en comportent pas (Levy *et al.* 1991; Levy *et al.* 1997). L'adoption de cette conformation pourrait être favorisée par la présence de fucose. De plus, *in vitro*, le taux d'association des xyloglucanes fucosylés à la cellulose est le double de celui des xyloglucanes non fucosylés (Levy *et al.* 1997).

De nouveaux travaux montrent l'influence de la masse moléculaire des polymères de xyloglucanes sur l'interaction avec la cellulose d'origine bactérienne (*Gluconacetobacter*), la formation des composites ainsi que leurs propriétés mécaniques (Whitney *et al.* 2006). Les xyloglucanes à masse moléculaire élevée offrent des composites homogènes. Les xyloglucanes contenant du fucose malgré leur basse masse moléculaire offrent des composites comparables à ceux obtenues par les polymères à haute masse moléculaire (Whitney *et al.* 2006). Ceci place les xyloglucanes fucosylés dans une zone de questionnement sur l'ampleur de leur implication mécanique au niveau de la paroi primaire des plantes ainsi que celle des tubes polliniques.

Les xyloglucanes présentent trois zones de liaison avec les microfibrilles (Pauly *et al.* 1999). En fait, uniquement les portions connues sous le nom de "crosslinking tethers" (bien illustrées sur la figure 13-Chapitre I) et qui servent d'attache entre les microfibrilles, sans entrer en contact direct avec, elles interviennent dans la mécanique de croissance. La croissance cellulaire ne se limite pas à un aspect mécanique uniquement. L'implication de nombreux systèmes enzymatiques est indispensable à l'accomplissement des modifications physiques permettant à la cellule de croître tout en conservant l'intégrité de sa paroi. Le réseau cellulose/hémicellulose n'échappe pas à son tour à cette action enzymatique lors de la croissance cellulaire.

L'enzyme XET ou xyloglucan endotransglycosylase contrôle l'extensibilité de la paroi en coupant et en reconnectant les chaînes de xyloglucane au sein de la matrice pariétale (Fry *et al.* 1992). En effet, la coupure et la nouvelle formation du lien glucosidique au sein de la chaîne de xyloglucane permettent à la paroi de s'étendre et à la cellule de croître sous l'effet de la pression interne sans pour autant compromettre la mécanique pariétale.

La transcription de l'un des gènes XET chez *Arabidopsis* est fortement influencée par différents stimuli comme le toucher, la noirceur, la chaleur, les chocs traumatiques (Braam *et al.* 1990), ainsi que par certains hormones tels que les brassinostéroïdes et l'auxine (Xu *et al.* 1995). Ce qui renforce l'idée que la croissance ne peut se réaliser en dehors du contexte environnemental.

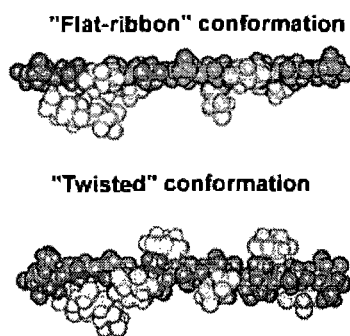


Fig.1. Les deux conformations possibles des xyloglucanes [www.ccruc.uga.edu](http://www.ccruc.uga.edu). Les zones claires correspondraient aux chaînes latérales attachées à la chaîne de glucose en plus foncé.

## 3.2 La biosynthèse et la distribution du fucose chez les plantes

Le fucose est un monosaccharide de formule chimique  $C_6H_{12}O_5$  associé aux glucans des mammifères, insectes et ceux de la paroi des plantes supérieures. Le fucose peut exister en tant que sucre terminal ou bien comme point d'attache pour l'addition d'autres sucres. Les études biochimiques ont permis de caractériser les enzymes impliquées dans la voie de synthèse du fucose (Bonin *et al.* 1997; Bonin *et al.* 2000).

Le gène *MUR1* d'*Arabidopsis thaliana* code pour l'enzyme GDP-D-mannose 4,6-déhydratase qui catalyse la première étape de synthèse *de novo* du GDP-L-fucose à partir du GDP-D-mannose (Bonin *et al.* 1997). Les gènes codant pour 3,5-épimérase et 4-réductase impliquées dans les étapes de synthèse ultérieures du L-fucose ont été séquencés par similarité aux gènes bactériens. Chez *Arabidopsis*, le gène *GER1* code pour cette enzyme bifonctionnelle, et *in vivo* sa combinaison à celle de *MUR1* permet de convertir le GDP-D-mannose à GDP-L-fucose (Bonin *et al.* 2000).

Le fucose est présent dans les chaînes latérales des polysaccharides de la paroi dont les xyloglucanes et à de faibles quantités dans celles des rhamnogalacturonans-I. Il est reconnu par l'anticorps monoclonal CCRC-M1 (Puhlmann *et al.* 1994). En microscopie à fluorescence, le même anticorps ne montre pas de marquage dans les parois du mutant *fut1* dans lequel la fucosylation des xyloglucanes est sélectivement abolie suite à une mutation insertionnelle du gène xyloglucane fucosyltransférase (Perrin *et al.* 2003).

Le CCRC-M1, utilisé pour marquer les xyloglucanes, permet de localiser leur distribution à travers le mutant d'*Arabidopsis mur1* (Freshour *et al.* 2003) qui exprime une réduction de 50 à 200 fois du L-fucose dans les parois des cellules des organes de la pousse et une réduction de 40% au niveau racinaire (Bonin *et al.* 1997).

Les poils racinaires de *mur1* sont intensément marqués, le corps de la racine ne l'est pas ou très légèrement marqué par l'anticorps CCRC-M1. De même, l'hypocotyle, les pousses, les feuilles et les stipules ne sont pas marquées. La paroi des grains de pollen au sein des anthères ainsi que celle des tubes polliniques a été marquée par l'anticorps CCRC-M1. L'immunomarquage des racines *mur1* en microscopie électronique est spécifique à un type particulier de cellules et de parois cellulaires. La croissance du mutant sur un milieu contenant du fucose assure la restauration du marquage de la paroi de toutes les cellules dans le type sauvage. Le fucose destiné à intégrer les xyloglucanes de la paroi cellulaire est synthétisé par l'un ou l'autre ou les deux isoformes du GDP-D-mannose 4,6-déhydratase. Cette synthèse dépend du type cellulaire et/ou de son stade de développement (Freshour *et al.* 2003).

### 3.3 Propriétés mécaniques du réseau - Rôle des chaînes latérales

Les xyloglucanes semblent jouer un rôle essentiel dans l'orientation des microfibrilles ainsi que dans la formation du réseau porte-charge au sein des parois primaires des plantes en croissance (Hayashi 1989). L'établissement d'un tel réseau procure à la paroi des structures primaires un équilibre entre son extensibilité lors de la croissance et sa résistance à la pression hydrique. L'existence d'une telle balance ne peut être assurée uniquement par les microfibrilles de cellulose (Whitney *et al.* 1999). Le réseau pariétal formé par les microfibrilles et la matrice est capable de supporter les hautes forces de tension générées par la pression de turgescence (Cosgrove 1999).

En effet, malgré le fait que les composites de cellulose et de xyloglucanes sont hautement interconnectés (Fig.2), ils sont moins rigides et plus extensibles que les fibrilles de cellulose (Fig.3) (Whitney *et al.* 2006). Les propriétés physiques de la paroi dépendent de la configuration de ses composants. L'association des xyloglucanes à la cellulose via des liaisons hydrogènes semble dépendre de la nature des chaînes latérales de ces hémicelluloses. Des mesures de tension uni-axiale ont été effectuées sur des composites de cellulose provenant d'*Acetobacter xylinus*, de pectines et de xyloglucanes. Les résultats montrent que la présence de pectines ou des xyloglucanes est responsable de l'augmentation de l'extensibilité et une diminution du stress de rupture (breaking stress) des composites et cela en comparaison avec la cellulose pure (Astley *et al.* 2003). De plus, les xyloglucanes semblent offrir plus d'extensibilité aux composites que les pectines.

Comme déjà mentionné, les xyloglucanes sont sujets à l'action enzymatique. Les résidus fucosylés peuvent être libérés de la chaîne d'oligosaccharide des xyloglucanes sous l'effet de l'enzyme fucosidase. Les enzymes qui modifient les xyloglucanes ont été identifiés dans la paroi cellulaire végétale (Fry 1995). Chez *Arabidopsis*, le gène *AtFXG1* code pour l'enzyme  $\alpha$ -L-fucosidase (de la Torre *et al.* 2002). Cette enzyme est capable de libérer le résidu fucosylé présent dans les chaînes latérales des xyloglucanes et son action a été détectée au niveau foliaire chez *Arabidopsis*.  $\alpha$ -L-Fucosidase a été également purifiée à partir d'épicotyles de *Pisum sativum* (Farkas *et al.* 1991; Augur *et al.* 1993).

Un groupe de mutants d'*Arabidopsis* complètement déficients en L-fucose montre une réduction de la croissance ainsi que des parois cellulaires fragiles (Reiter *et al.* 1993). Cependant, l'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en xyloglucanes fucosylés ne montre pas de phénotype mécanique.

Ceci suppose que la fucosylation n'est pas requise pour le développement et les performances mécaniques d'une plante (Ryden *et al.* 2003; Pena *et al.* 2004).

Les xyloglucanes fucosylés sont également connus comme étant des molécules de signalisation jouant un rôle dans la croissance cellulaire contrôlée par l'auxine (Zabackis *et al.* 1996).

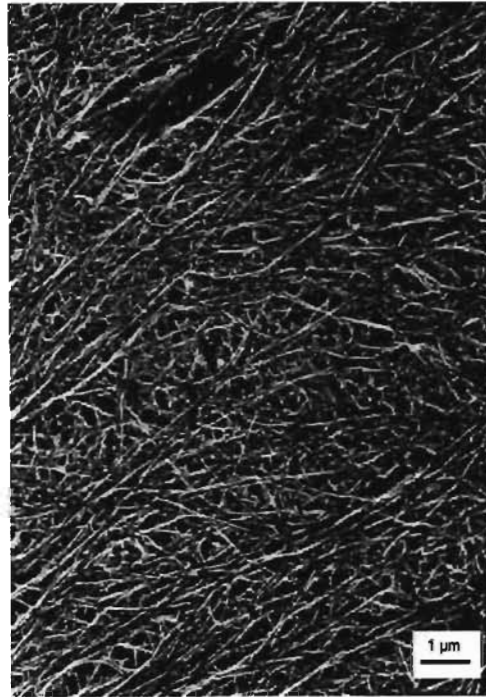


Fig.2. Le réseau de cellulose d'origine bactérienne en présence de xyloglucanes d'origine végétale vu en microscopie électronique à transmission (deep-etch freeze fracture) (*Whitney et al. 2006*)

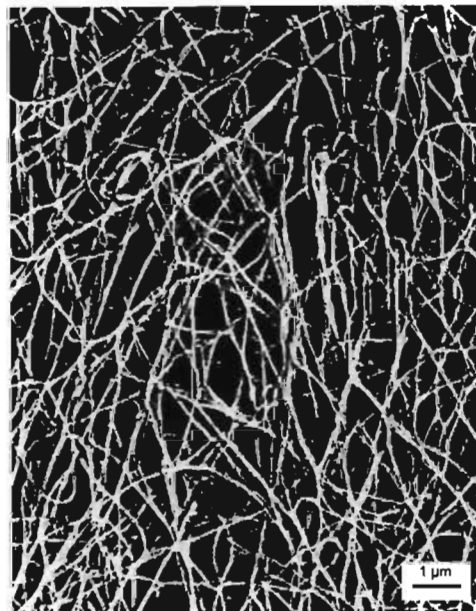


Fig.3. L'absence de connexion entre les fibrilles de cellulose bactérienne et les xyloglucanes ayant 35% depleted-galactose dans leurs chaînes latérales. À noter l'apparence isotropique de l'arrangement de ces fibrilles vues en microscopie électronique à transmission (deep-etch freeze fracture) (*Whitney et al. 2006*)

### **3.4 Objectifs et Motivations**

Le fucose est l'un des sucres des chaînes d'hémicelluloses des parois cellulaires primaires. Nous allons investiguer d'abord sa présence dans la paroi cellulaire du tube pollinique. De plus, du fait de son rôle potentiel dans la formation du réseau cellulose/hémicellulose, nous tenterons de décrire son rôle dans la croissance apicale des tubes polliniques. En éliminant le fucose des chaînes latérales des xyloglucanes, nous essayerons de délimiter le rôle de ce sucre en particulier et celui du réseau en général et ce dans un contexte de mode de croissance apicale. Les stratégies de marquages permettant de localiser ce sucre dans la paroi seront associées à la microscopie à fluorescence et électronique à transmission.



## 3.5 Matériels et Méthodes

### 3.5.1 Matériel végétal

Les anthères de *Lilium orientalis* ont été récupérés chez un fleuriste de Montréal et séchés pour 24h. Une fois le pollen récolté, il subit une déshydratation de 24h sur le gel de silicate avant d'être ensuite gardé sous -80°C. Pour *Solanum chacoense*, le pollen, issu des plantes provenant des serres du jardin botanique, a été déshydraté pour 24h sur le gel de silicate. Ce pollen a été conservé à -20°C.

### 3.5.2 Culture de pollen

La germination du pollen *in vitro* impose une étape préalable et critique qu'est la réhydratation à température ambiante qui dure environ 30min. La culture se fait dans un milieu liquide de croissance contenant 0.29 mg mL<sup>-1</sup> MES, 0.01 mg mL<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0147 mg mL<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, et 50 mg mL<sup>-1</sup> de sucrose. Approximativement 5 mg de pollen sont ajoutés à 4 ml de milieu de croissance dans des Erlenmeyer de 25 ml. L'incubation a lieu à l'obscurité 25°C et sous agitation continue. Afin d'éviter l'obtention de tubes extrêmement longs et difficiles à manipuler, le temps de germination est fixé à 2h.

### 3.5.3 Traitement enzymatique

L'enzyme  $\alpha$ -fucosidase (achetée chez Sigma Montréal-Canada) a été utilisée après la germination des tubes pendant 2h. Les différentes concentrations de l'enzyme sont les suivantes : 0.015 unités/mL, 0.045 unités/mL, 0.060 unités/mL et 0.075 unités/mL.

### 3.5.4 Observations en champ clair

Les tubes polliniques traités avec différentes concentrations de l'enzyme  $\alpha$ -L-fucosidase sont ensuite filtrés et fixés à température ambiante et pour une heure dans 3% de formaldéhyde fraîchement préparé dans du Pipes buffer (1 mM EGTA, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Pipes). La fixation se fait à différents laps de temps suivant l'application de l'enzyme. Après fixation, le pollen est monté entre lame et lamelle pour effectuer les observations.

### 3.5.5 Microscopie à fluorescence

Pour effectuer l'immunomarquage en fluorescence de la paroi, les tubes ont été filtrés et ensuite fixés avec 3% de formaldéhyde et 0.5% de glutaraldéhyde dans le tampon Pipes pour 30 min. Après lavage, le pollen est incubé avec l'anticorps monoclonal CCRC-M1 (Carbosource-Athens, GA, USA) dilution 1:50 dans PBS buffer et 2% BSA, suivi d'une incubation avec goat anti-mouse IgG–Alexa Fluor 594 (dilution 1:100 in buffer; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). L'anticorps CCRC-M1 reconnaît l'épitope  $\alpha$ -Fuc-(1,2)- $\beta$ -Gal des chaînes latérales des xyloglucanes. Le pollen est ensuite monté entre lame et lamelle et observé avec la microscopie à fluorescence au moyen d'un filtre Texas red. Le microscope à fluorescence de marque Zeiss Axio Imager Z.1 est équipé d'une caméra AxioCam MR. Les images sont obtenues avec le logiciel AxioVision Rel. 4.5. Les tubes contrôle sont obtenus par omission de l'anticorps primaire ou secondaire.

### 3.5.6 Microscopie électronique à transmission

Les spécimens destinés à la microscopie électronique à transmission sont fixés avec 2% formaldéhyde, 2.5% glutaraldéhyde fraîchement préparés dans 0.05M phosphate buffer (pH 7.2). Après deux lavages avec phosphate buffer, le pollen fixé est suspendu dans 3% d'agarose afin de faciliter sa manipulation. Des cubes de 1mm de côté sont découpés à la

suite de la gélification de l'agarose et sont ensuite déshydratés dans des séries d'éthanol avant d'être incubés avec de la résine L.R. White. Trois incubations successives d'une durée d'une heure chacune auront lieu et seront suivies d'une autre pour la nuit à température ambiante. La polymérisation de la résine se fait dans des capsules gélatineuses à 60°C pendant 24 h. Les blocks sont travaillés et la coupe se fait avec un couteau au diamant et en utilisant un Leica Ultracut ultramicrotome. Les coupes ont une épaisseur d'environ 70 nm.

## **3.6 Résultats**

### **3.6.1 Immunomarquage des xyloglucanes en microscopie à fluorescence**

Dans le but de révéler la présence des xyloglucanes dans la paroi des tubes polliniques, nous avons procédé à leur marquage. Le marquage en microscopie à fluorescence a pour cible les xyloglucanes fucosylés et est réalisé avec l'anticorps CCRC-M1. La fluorescence selon les dilutions, surtout de l'anticorps primaire CCRC-M1, touchait à la fois les parties distale et apicale ou bien uniquement la partie distale des tubes (Fig.4 et 5). Cette méthode ne permet donc pas de dire clairement si l'apex a un contenu en xyloglucanes différent de celui de la région distale.

### **3.6.2 Localisation des xyloglucanes en microscopie électronique à transmission**

Pour mieux caractériser la distribution des xyloglucanes par l'immunomarquage, je me suis tournée vers la microscopie électronique sans pour autant pouvoir trancher sur la présence apicale des xyloglucanes fucosylés. Chez *Solanum chacoense*, la microscopie électronique à transmission ne révéla aucun marquage au niveau de la paroi des grains de pollen ainsi que celle des tubes polliniques (Fig.6). En fait, nos résultats sont consistants avec, sans pour autant justifier, l'absence de fucose des chaînes latérales des xyloglucanes chez un représentant de la famille des solanacées connue dans la littérature pour l'absence de fucose dans leurs hémicelluloses. Par contre, les xyloglucanes chez *Lilium orientalis* ont été marqués grâce au fucose à la fois dans la paroi des grains de pollen et des tubes (Fig.7). Au niveau des grains de pollen, ils semblent être localisés dans l'intine. Ce marquage a été

observé sur des coupes préparées d'échantillons enrobés dans deux types de résines - Spurr et LR-White.

Malgré le haut degré de liaisons covalentes entre la résine Spurr et le matériel (Newman *et al.* 1999) qui d'habitude affecterait l'efficacité de l'immunomarquage, l'enrobage dans le Spurr n'a pas empêché le marquage de cet antigène et les sections obtenues de ce matériel ont produit les mêmes résultats que celles enrobées dans le LR-White.

### **3.6.3 La croissance du tube pollinique est affectée par l'élimination du fucose**

Pour étudier l'éventuel rôle du fucose dans la croissance apicale nous avons ajouté l'enzyme à des tubes polliniques pré-germés de *Lilium*. La direction de croissance change après l'application de l'enzyme. Il s'agit probablement d'un arrêt temporaire de la croissance suivie de sa nouvelle reprise, comme c'est probablement le cas pour les tubes soumis au traitement par la cellulase. Ce changement est déjà perceptible à 0.015 unités  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 8) et se maintient à 0.0045 unités  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 9) et à 0.006 unités  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 10). De plus, à cette concentration on note déjà l'apparition de changements de la morphologie des tubes.

On note également, en plus du changement de la direction de croissance, un changement au niveau de la morphologie apicale (Fig. 9 et 10). Le tube est incapable de contrôler son diamètre donnant lieu à des formes bulbeuses reflétant des distorsions au niveau de la paroi. L'effet de l'enzyme semble se maintenir avec le temps. En effet, le pourcentage de tubes présentant un changement de direction de croissance et des irrégularités morphologiques augmente en fonction du temps d'application de l'enzyme  $\alpha$ -fucosidase en passant de 40% à 0.045 unités  $\text{mL}^{-1}$  à plus de 46% à 0.060 unités  $\text{mL}^{-1}$ .

Fig. 4. Deux exemples du marquage des xyloglucanes avec le CCRC-M1 des tubes de *Solanum chacoense*. Les tubes, après 4h de croissance, montrent un marquage des parties distale et/ou apicale des tubes. Barre = 10  $\mu$ m

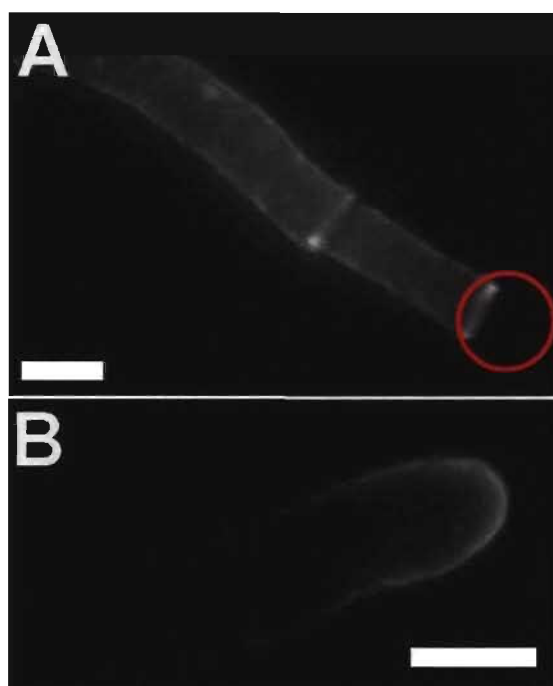
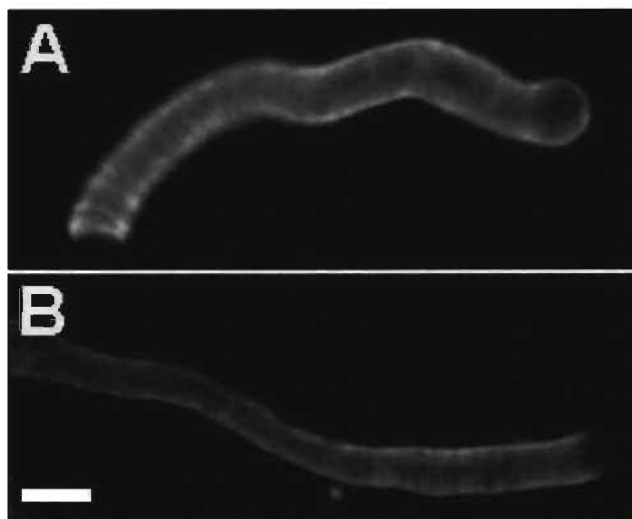


Fig. 5. Deux exemples de marquage des xyloglucanes avec le CCRC-M1 des tubes de *Lilium orientalis*. Les tubes, après 2h de croissance, montrent un marquage des parties distale et/ou apicale des tubes. En A, le cercle rouge délimite la partie apicale ne présentant pas de marquage du fucose. Barre = 17  $\mu$ m

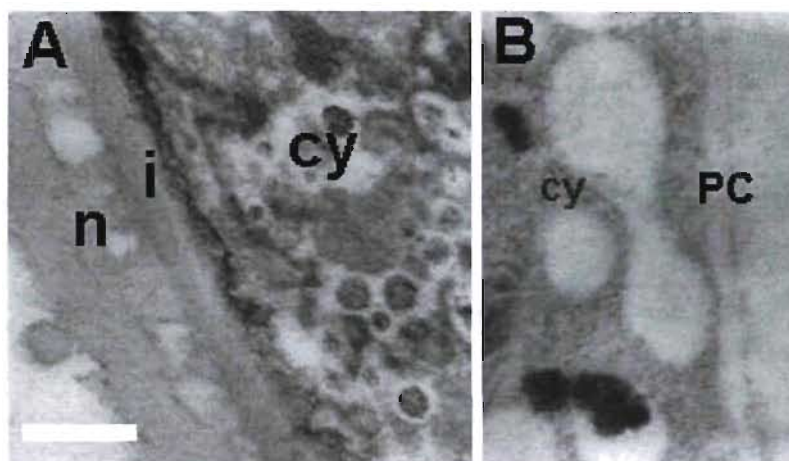


Fig.6. Micrographes en microscopie électronique à transmission de coupes marquées pour xyloglucanes avec l'anticorps CCRC-M1 au niveau de la paroi du grain de pollen (A) et tube pollinique (B) de *Solanum chacoense*. Aucun marquage est visible. Cy : cytoplasme, i : intine, n : nexine. Barre = 0.4  $\mu$ m (A et B)

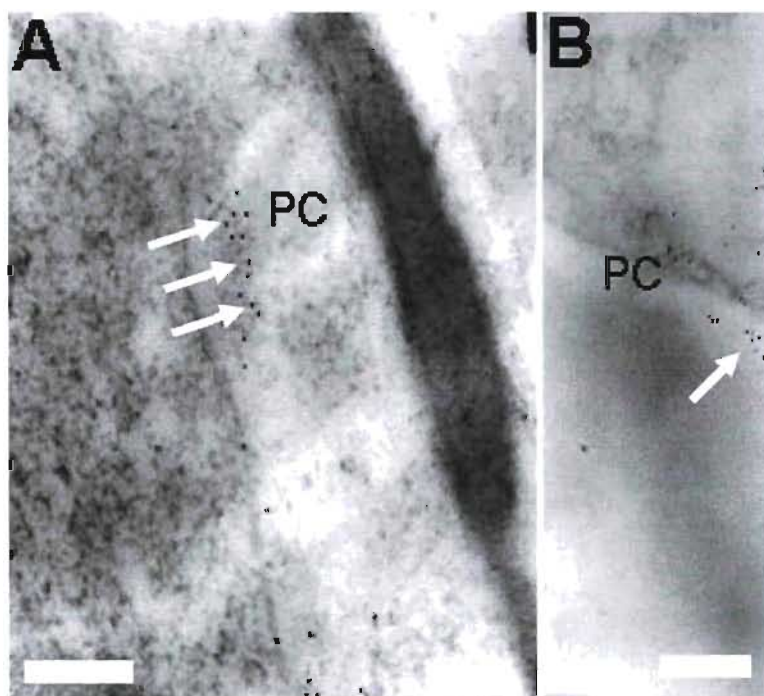


Fig.7. Micrographes du marquage des xyloglucanes avec l'anticorps CCRC-M1 au niveau de la paroi du grain de pollen (A) et la paroi d'un tube (B) de *Lilium orientalis*. PC= paroi cellulaire. Le marquage est associé à la paroi cellulaire. Barre = 0.25  $\mu$ m

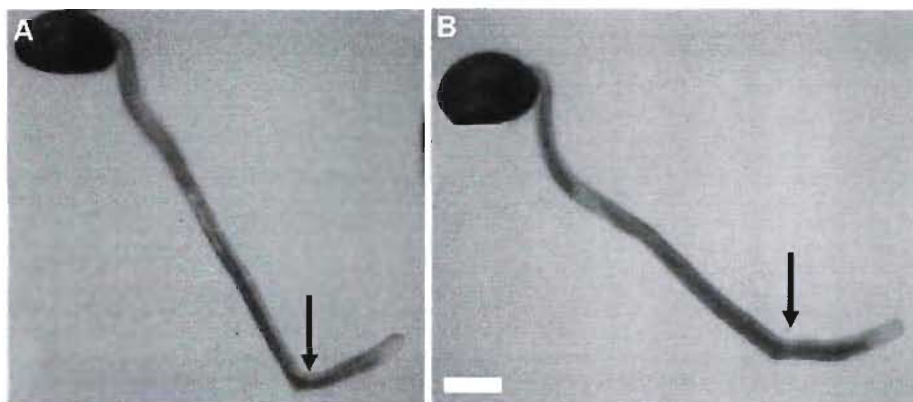


Figure 8. Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase ( $0.015 \text{ unités mL}^{-1}$ ) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. Les flèches marquent le moment auquel l'enzyme ayant causée le changement de direction de croissance dans A et B a été appliquée. À cette concentration de l'enzyme, ce changement de direction ne se s'accompagne pas de modifications de la morphologie apicale. Barre =  $30 \mu\text{m}$

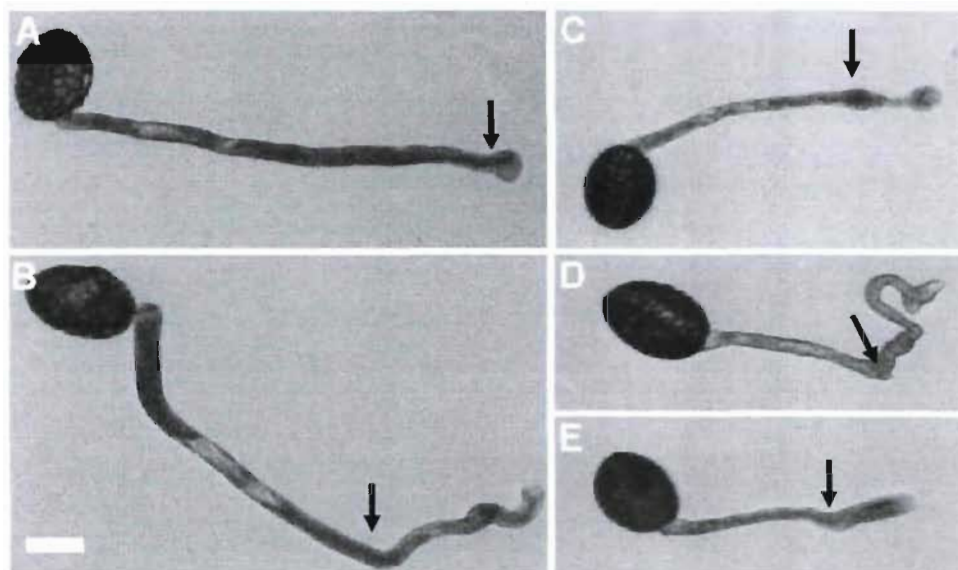


Figure 9. Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase ( $0.045 \text{ unités mL}^{-1}$ ) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. On peut noter les modifications de la morphologie apicale qui renfle en A et en C. Le diamètre de la partie apicale augmente causant des formes bulbeuses en C, D et E. En B, on note la croissance du tube en spirale. Barre =  $30 \mu\text{m}$



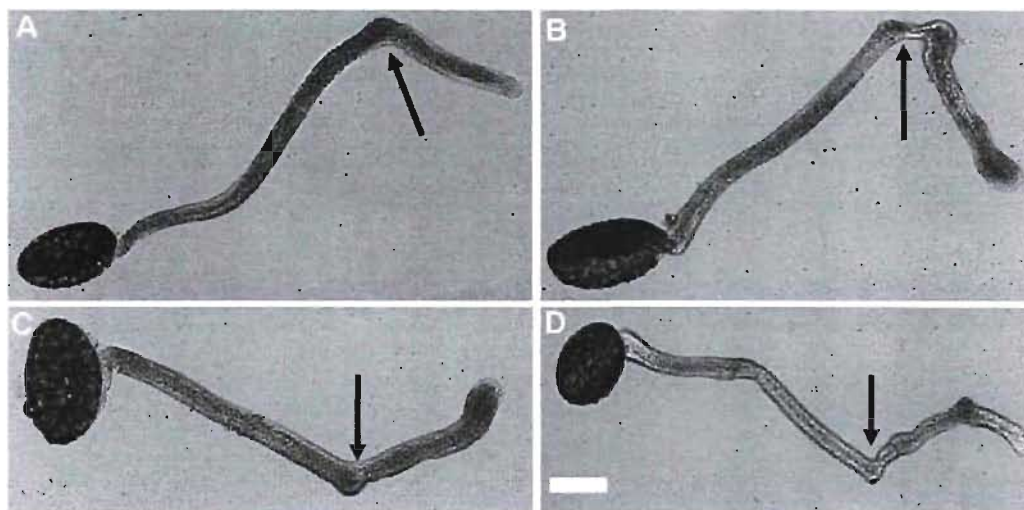


Figure 10. Application de l'enzyme  $\alpha$  fucosidase ( $0.060 \text{ unités mL}^{-1}$ ) après 2h de croissance en milieu liquide des tubes polliniques de *Lilium orientalis*. Les flèches marquent le moment auquel l'enzyme ayant causée le changement de direction de croissace. Barre =  $30 \mu\text{m}$

### 3.7 Discussion

La localisation des xyloglucanes au sein de la paroi des tubes polliniques est une tâche qui requiert une bonne connaissance de cette famille d'hémicelluloses qui possède une variété de sucres terminaux. Ils sont connus comme étant, en association avec la cellulose, les composants du réseau porte-charge des parois primaires. L'originalité des xyloglucanes réside dans le rajout des chaînes latérales sans lesquelles les xyloglucanes ne seraient que des chaînes de glucose semblables à celles de la cellulose. Plus encore, le réseau cellulose/xyloglucanes ne pourrait exister sans ces chaînes latérales. Leur composition revêt une importance cruciale. La nature chimique des sucres latéraux ainsi que leur masse moléculaire sont des critères décisifs dans la formation du réseau ainsi que la détermination de ses propriétés physiques. La masse moléculaire influence la proportion de la connexion entre xyloglucanes et cellulose (Whitney *et al.* 2006). En effet, le galactose et le fucose modulent les propriétés mécaniques du réseau.

Des mutants d'*Arabidopsis* pour les gènes *MUR2* et *MUR3* qui codent respectivement pour des fucosyl et galactosyl transférases ont été étudiés. Les mesures de la force de tension au niveau de l'hypocotyle révèlent que la galactosylation plutôt que la fucosylation des chaînes latérales est essentielle pour le maintien de la résistance mécanique des parois cellulaires (Reiter *et al.* 1997; Pena *et al.* 2004). Le pollen est rarement ou presque pas étudié dans ces mutants.

L'étude des propriétés physiques de la paroi en fonction de la composition des chaînes latérales des xyloglucanes permet de mieux comprendre le fonctionnement du réseau cellulose/xyloglucanes chez les tubes polliniques. L'enzyme  $\alpha$  fucosidase est employée dans le but d'étudier l'effet du fucose sur la constitution de réseau et son impact sur l'accomplissement et le maintien de la croissance apicale.

La localisation exclusive des xyloglucanes à la partie distale du tube n'a pu être établie de façon précise. La présence des xyloglucanes dans la partie apicale du tube est possible à cause de des liaisons entre pectines et xyloglucanes dans la paroi primaire (Popper *et al.* 2005). D'autres travaux permettraient de trancher. L'implication mécanique des connections pectines et xyloglucanes dans les parois primaires n'est toujours pas élucidée. Même si nous supposons que les xyloglucanes se localisent uniquement en zone distale, la modification de la composition chimique de leurs chaînes latérales affecte la croissance à différents égards. Dans le cas où les xyloglucanes seraient en liaisons covalentes avec les pectines de l'apex, la question est de définir un rôle mécanique tout comme celui des pectines (Parre *et al.* 2005) dans la croissance des tubes polliniques. Ce qu'on peut noter, c'est la modification de la morphologie apicale ainsi que la direction de croissance suite au traitement enzymatique.

L'importance du rôle du fucose dépend essentiellement du type ainsi que du stade de développement cellulaire (Michael Hahn, communication personnelle). L'étude de mutants porte le plus souvent sur des tissus entiers et non sur des cellules isolées en croissance. Ceci rend la comparaison des changements morphologiques obtenus lors de notre étude et d'autres systèmes végétaux ardue. La manifestation des effets sur la morphologie est plus amplement distinguable dans le cas des tubes polliniques, cellules végétales, isolées et en pleine croissance.

Le diamètre de la zone apicale est modifié ce qui laisse penser à une perturbation de l'architecture du réseau cellulose/hémicelluloses et par conséquent celui de la paroi en tant que réseau plus large. Devant ce déséquilibre, l'aptitude de la paroi à développer une force de tension lui permettant de faire face à la pression hydrostatique et de garder une forme parfaitement cylindrique est perturbée.

Ceci résulte en un changement du diamètre et ce toujours en zone subapicale ce qui vient renforcer les résultats obtenus dans le chapitre II.

La cellulose joue un rôle dans la mécanique de croissance dans la zone subapicale. Les changements morphologiques développés suite aux traitements chimiques reflètent le rôle crucial dans une zone d'instabilité mécanique relative et où la callose fait défaut. En fait, chez les tubes polliniques, cellulose et xyloglucanes pourraient jouer un rôle en tant que réseau porte charge tout comme dans les parois primaires chez les plantes supérieures. La zone subapicale est encore une fois le siège de changements morphologiques après élimination du fucose. Ceci vient jeter la lumière sur l'implication possible du réseau dans le maintien du diamètre subapical et de la direction de croissance ainsi que de son accomplissement de façon anisotrope.

De plus, les xyloglucanes et leur possible connection avec les pectines de l'apex reste à vérifier d'un point de vue mécanique. La déstabilisation possible du réseau du fait de l'élimination du fucose pourrait s'inscrire dans une perturbation plus étendue de la configuration de la matrice pariétale touchant à son intégrité face à la pression interne.

### 3.8 Bibliographie

- Astley, O. M., E. Chanliaud, A. M. Donald and M. J. Gidley (2003). "Tensile deformation of bacterial cellulose composites." International Journal of Biological Macromolecules **32**(1-2): 28-35.
- Augur, C., N. Benhamou, A. Darvill and P. Albersheim (1993). "Purification, characterization, and cell-wall localization of an alpha-fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin." Plant Journal **3**(3): 415-426.
- Bonin, C. P., I. Potter, G. F. Vanzin and W. D. Reiter (1997). "The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(5): 2085-2090.
- Bonin, C. P. and W. D. Reiter (2000). "A bifunctional epimerase-reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose in *Arabidopsis*." Plant Journal **21**(5): 445-454.
- Braam, J. and R. W. Davis (1990). "Rain-induced, wind-Induced, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*." Cell **60**(3): 357-364.
- Cosgrove, D. J. (1999). "Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**: 391-417.
- Cosgrove, D. J. (2000). "Expansive growth of plant cell walls." Plant Physiology, **38**(1-2): 109-124.
- de la Torre, F., J. Sampedro, I. Zarra and G. Revilla (2002). "AtFXG1, an *Arabidopsis* gene encoding alpha-L-fucosidase active against fucosylated xyloglucan oligosaccharides." Plant Physiology **128**(1): 247-255.

- Farkas, V., R. Hanna and G. Maclachlan (1991). "Xyloglucan oligosaccharide  $\alpha$ -L-fucosidase activity from growing *pea* stems and germinating *Nasturtium* seeds." Phytochemistry **30**(10): 3203-3207.
- Freshour, G., C. P. Bonin, W.-D. Reiter, P. Albersheim, A. G. Darvill and M. G. Hahn (2003). "Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis*." Plant Physiology **131**(4): 1602-1612.
- Fry, S. C. (1995). "Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **46**: 497-520.
- Fry, S. C., R. C. Smith, K. F. Renwick, D. J. Martin, S. K. Hodge and K. J. Matthews (1992). "Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme-activity from plants." Biochemical Journal **282**: 821-828.
- Hayashi, T. (1989). "Xyloglucans in the primary-cell wall." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**: 139-168.
- Keegstra, K., K. W. Talmadge, W. D. Bauer and P. Albersheim (1973). "The structure of plant cell wallsIII A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components." Plant Physiology **51**: 88-196.
- Levy, S., G. Maclachlan and L. A. Staehelin (1997). "Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations." Plant Journal **11**(3): 373-386.
- Levy, S., W. S. York, R. Stuikeprill, B. Meyer and L. A. Staehelin (1991). "Simulations of the static and dynamic molecular-conformations of xyloglucan - the role of the fucosylated side-chain in surface-specific side-chain folding." Plant Journal **1**(2): 195-215.
- Newman, G. and J. Hobot (1999). "Resins for combined light and electron microscopy: A half century of development." Histochemical Journal **31**(8): 495-505.
- Parre, E. and A. Geitmann (2005). "Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*." Planta **220**(4): 582-592.

- Passioura, J. B. and S. C. Fry (1992). "Turgor and cell expansion - Beyond the Lockhart equation." Australian Journal of Plant Physiology **19**(5): 565-576.
- Pauly, M., P. Albersheim, A. Darvill and W. S. York (1999). "Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants." Plant Journal **20**(6): 629-639.
- Pena, M. J., P. Ryden, M. Madson, A. C. Smith and N. C. Carpita (2004). "The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth." Plant Physiology **134**(1): 443-451.
- Perrin, R. M., Z. H. Jia, T. A. Wagner, M. A. O'Neill, R. Sarria, W. S. York, N. V. Raikhel and K. Keegstra (2003). "Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*." Plant Physiology **132**(2): 768-778.
- Popper, Z. A. and S. C. Fry (2005). "Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells." Annals of Botany **96**(1): 91-99.
- Puhlmann, J., E. Bucheli, M. J. Swain, N. Dunning, P. Albersheim, A. G. Darvill and M. G. Hahn (1994). "Generation of monoclonal-antibodies against plant cell-wall polysaccharides .1. Characterization of a monoclonal-antibody to a terminal alpha-(1-2)-linked fucosyl-containing epitope." Plant Physiology **104**(2): 699-710.
- Reiter, W.-D., C. Chapple and C. R. Somerville (1997). "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition." Plant Journal **12**(2): 335-345.
- Reiter, W. D., C. C. S. Chapple and C. R. Somerville (1993). "Altered growth and cell-walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*." Science **261**(5124): 1032-1035.
- Ryden, P., K. Sugimoto-Shirasu, A. C. Smith, K. Findlay, W. D. Reiter and M. C. McCann (2003). "Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes." Plant Physiology **132**(2): 1033-40.

- Whitney, S. E. C., M. G. E. Gothard, J. T. Mitchell and M. J. Gidley (1999). "Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls." Plant Physiology **121**(2): 657-664.
- Whitney, S. E. C., E. Wilson, J. Webster, A. Bacic, J. S. G. Reid and M. J. Gidley (2006). "Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interactions with bacterial cellulose." American Journal of Botany **93**(10): 1402-1414.
- Xu, W., M. M. Purugganan, D. H. Polisensky, D. M. Antosiewicz, S. C. Fry and J. Braam (1995). "*Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase." Plant Cell **7**(10): 1555-1567.
- Zablackis, E., W. S. York, M. Pauly, S. Hantus, W.-D. Reiter, C. C. S. Chapple, P. Albersheim and A. Darvill (1996). "Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*." Science **272**(5269): 1808-1810.



## ***Chapitre IV : Discussion générale et conclusions***

Pour les cellules végétales, entourées de leurs parois cellulaires et soumises à la pression interne. La croissance implique la synthèse de nouveau matériel et la déformabilité de la paroi existante (Dumais *et al.* 2004). L'expansion est donc régie par la balance entre l'incorporation de polymères pariétaux, les propriétés mécaniques de la paroi et la pression interne.

La paroi, la turgescence ainsi que le cytosquelette jouent des rôles cruciaux dans le processus de croissance. La turgescence des cellules végétales est un état causé par une entrée d'eau dans ces dernières. Lorsque le volume vacuolaire devient plus important ceci opère une pression sur la paroi cellulaire. La paroi primaire joue en plus de son rôle physiologique un rôle mécanique. Son réseau de polysaccharides est impliqué dans la résistance au stress de tension que génère la pression hydrostatique interne (Cosgrove 1997).

Les microfibrilles de cellulose similaires à des câbles et déposées en couches suivant une orientation spatiale déterminée permettent à la paroi de résister à la pression osmotique (Somerville 2006). L'expansion cellulaire est anisotrope quand le taux d'expansion de la paroi cellulaire est différent d'une direction à l'autre. Elle est isotrope quand l'expansion se fait au même taux dans toutes les directions (Baskin 2005). La nette direction d'alignement des microfibrilles régule la direction du taux maximal de l'expansion anisotrope (Baskin 2005).

Plus précisément, le réseau cellulose/xyloglucanes représente le système porte charge de la paroi au cours de la croissance (Whitney *et al.* 1999; Cosgrove 2000). Les rôles respectifs de chacun des composants de la paroi dans cette résistance ne sont pas toujours séparables. En tenant compte des connections possibles entre pectines et xyloglucanes au niveau de la paroi primaire chez les angiospermes (Popper *et al.* 2005), la performance de la paroi lors de la croissance cellulaire serait le résultat de l'implication de tous ses composants chimiques.

Les tubes polliniques tout comme les neurones, les poils racinaires et les hyphes fongiques ont une croissance unidirectionnelle (Heath 1990). Parmi ces cellules, les tubes polliniques ont le plus haut taux de croissance et cette croissance rapide est soutenue par une sécrétion de larges quantités de matériel destiné à la paroi. L'expansion est, dans le cas de la croissance apicale, confinée à l'apex de la cellule contrairement à la croissance diffusé qui touche une ou plusieurs facettes de la cellule (Baskin 2005). Dans ce dernier type, l'expansion de la surface cellulaire est plus ou moins uniformément distribuée sur la totalité de la cellule (Castle 1955; Green 1963). Le processus d'expansion semble toujours maintenu par la force exercée conjointement par la force hydrostatique interne, le cytosquelette ainsi que l'intégration des composants pariétaux (Taiz 1984; Cosgrove 1986; Money 1997).

Les cellules à croissance apicale forment des longs cylindres se terminant par un dôme oviforme, lieu de l'expansion de la cellule (Haberlandt 1887; Reinhardt 1892; Castle 1958; Chen 1973; Shaw *et al.* 2000). La morphologie cellulaire empiète sur la distribution des stress (Baskin 2005). Le stress circonférentiel causé dans la paroi par la pression interne est double de celui qui agit longitudinalement (Fig.1) (Probine *et al.* 1962).

Les cellules à croissance apicale concentrent les vésicules sécrétrices vers l'apex ou se trouve un gradient de calcium qui module leur fusion avec la membrane plasmique (Miller *et al.* 1992; Bibikova *et al.* 1997). Chez les hyphes fongiques, la paroi est une structure complexe de chitine, de glucanes ainsi que d'autres polymères interconnectés (Adams 2004). Les poils racinaires ont une paroi constituée de microfibrilles de cellulose adoptant différentes textures dépendamment de leur localisation dans la paroi (Emons *et al.* 1983). Dispersées à l'apex, elles s'arrangent en lamelles hélicoïdales en s'éloignant de la zone apicale (Emons *et al.* 1983).

À la déhiscence des anthères, le pollen est déshydraté et sera transporté par différents moyens pollinisateurs. De plus, il est doté d'une paroi protectrice lui permettant de résister aux conditions défavorables à la germination. Depuis le début de la germination et tout le long de sa croissance *in vivo*, un tube pollinique est bombardé de messages chimiques le guidant dans son parcours vers les ovules. De plus, les contraintes physiques auxquelles le tube fait face sont différentes d'une espèce à l'autre et difficilement reproductibles en laboratoire. Malgré le fait que les grains de pollen soient considérés comme des cellules isolées, ils n'échappent pas pour autant aux contraintes physiques de leur milieu de croissance. La croissance *in vitro* des tubes polliniques permet une étude du processus malgré l'absence d'une structure physique comparable aux pistils floraux.

La composition pariétale complexe des tubes polliniques semble être bien adaptée à leur mode de croissance apicale. La partie distale ne s'étend pas sous l'effet et de la pression hydrostatique grâce à sa composition chimique qui lui permet d'adopter et de garder une forme parfaitement cylindrique (Geitmann et Steer 2006). L'apex est continuellement ravitaillé par les vésicules provenant du Golgi. La paroi apicale, majoritairement composée de pectines, est soumise à l'extension maintenue par la pression et soutenue par l'apport de nouvelles vésicules. La déposition du matériel de la paroi n'est pas suffisante à elle seule à maintenir l'expansion et causerait l'épaississement de la paroi à l'apex. De même

l'extensibilité seule, sous l'effet de la pression hydrostatique, causerait l'amincissement de la paroi et par la suite sa rupture (Dumais *et al.* 2006).

La composition non-uniforme de la paroi des tubes polliniques, ne croissant pas de façon diffuse, la distingue de celle de la paroi de la plupart des autres cellules végétales. Pour les tubes polliniques, deux principaux composants marquent sa composition pariétale. La callose et les pectines en sont les principaux constituants. Ces deux composants permettent respectivement de résister à la tension circonférentielle et à définir un gradient de rigidité (Parre et Geitmann 2005a; Parre et Geitmann 2005b) conférant au tube ses propriétés mécaniques indispensables à son mode de croissance apicale. La charpente que représente la paroi végétale pour les protoplastes se construit de façon graduelle grâce à une synthèse soutenue de nouveaux matériaux (Majewska-Sawka *et al.* 2002). La synthèse des différents composants doit être orchestrée afin de remplir le rôle de faire face à la pression cellulaire interne de façon efficace.

Des tentatives de modélisation de la croissance apicale ont été mises en place. Plusieurs modèles s'intéressent à la croissance apicale des hyphes fongiques (Bartnicki-Garcia *et al.* 1989) et des poils racinaires (Dumais *et al.* 2004; Dumais *et al.* 2006). En ce qui concerne les tubes polliniques, aucun modèle tenant compte à la fois de la géométrie de la cellule ainsi que de sa physiologie n'a pu encore voir le jour.

En ce qui concerne la cellulose, malgré le fait qu'on la retrouve à de très faibles proportions dans la paroi des tubes polliniques d'angiospermes, uniquement 10% dans la paroi des tubes de *Nicotiana glauca* à 4h de croissance (Schlupmann *et al.* 1994), elle semble jouer un rôle non négligeable. Ce rôle est confirmé par un changement de la morphologie des tubes sous l'effet de l'inhibiteur CGA et de la cellulase. De même, malgré le manque d'informations sur la présence des xyloglucanes dans la paroi des tubes polliniques, nos

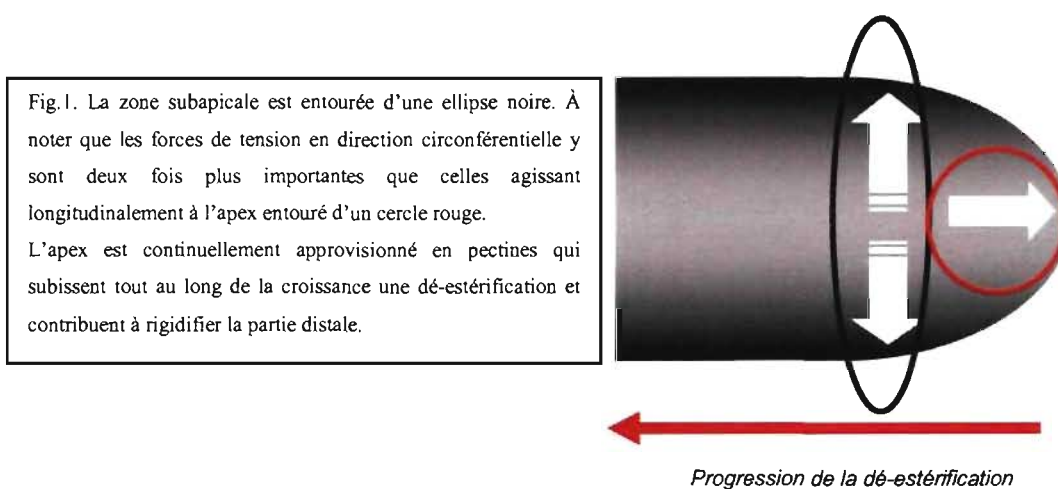
expériences montrent une possible implication de ce groupe d'hémicelluloses dans la croissance apicale.

La réduction des taux de cellulose par digestion et de la cellulose cristalline par inhibition a causé également la diminution des taux de la callose dans les parties traitées, qui supporte la vision de la paroi en tant que réseau interconnecté et dont les composants n'échappent pas aux traitements touchant spécifiquement à l'un de ses polysaccharides.

De plus, la perturbation de la construction de cette charpente induit des ajustements adoptés par la paroi visant la restructuration du réseau pariétal. La synthèse accrue du composant clef de la paroi, les pectines, offrant un gradient de rigidité à la paroi (Parre et Geitmann 2005b), supporte le rôle que joue la cellulose malgré sa présence uniquement en faibles proportions au sein de la charpente pariétale des tubes polliniques. La capacité des tubes de compenser le manque de cellulose, suite à sa digestion, rappelle le même phénomène chez certaines plantes. Celles-ci montrent une certaine plasticité de la synthèse des polysaccharides de la paroi vis-à-vis des variations des conditions environnantes. Chez le tabac, le silencing d'un gène de synthèse de la cellulose entraîne la réduction des taux de cellulose qui est compensée par une augmentation de la synthèse des homogalacturonans (Burton *et al.* 2000). Chez *Arabidopsis*, le mutant *Korrigan* montre une hausse de la présence d'homogalacturonans dans les parois de ses cellules de l'épiderme (His *et al.* 2001). Ceci est expliqué par une compensation de la baisse des taux de cellulose et par conséquent du réseau cellulose/xyloglucanes. De plus, l'augmentation des composants pectiques pourrait pallier à la diminution de la force de tension de la paroi assurée par le dit réseau (His *et al.* 2001).

La survie des cellules de tomates en culture à l'inhibition de la synthèse de la cellulose par le DCB 2,6-dichlorobenzonitrile, est assurée par une augmentation des proportions des composés pectiques (Shedletzky *et al.* 1990; Shedletzky *et al.* 1992). Les tubes polliniques rejoignent ces structures végétales dans leur remarquable flexibilité permettant de s'adapter et de tolérer les changements dans la composition de leurs parois cellulaires.

D'après les altérations morphologiques obtenues suite à l'emploi de diverses drogues et enzymes, nous pourrions conclure que la cellulose contribue dans le maintien de la forme cylindrique des tubes. Son rôle semble avoir des proportions importantes en zone subapicale proche de la zone de croissance. Cette zone est le lieu du changement le plus dramatique de la configuration chimique de la paroi (Fig.1). De plus, la géométrie subit une transformation passant d'une forme approximativement hémisphérique à cylindrique. Cette transition est rendue possible par le changement de la configuration et les taux des composants de la paroi.



Les changements de la morphologie consistent essentiellement en un renflement apical. On note également des irrégularités dans la croissance. Ce qui peut définir un rôle dans la détermination du diamètre chez ces cellules. Des phénotypes similaires s'observent dans les tubes polliniques traités avec un inhibiteur de la synthèse de cellulose (Anderson *et al.* 2002). Chez *Pétunia* et *Lilium*, la réduction des taux de synthèse de cellulose cause des distorsions de la paroi et l'apparition des formes bulbeuses (Anderson *et al.* 2002). De même, les tubes de conifères répondent par un renflement apical à la perturbation de la synthèse de la cellulose (Lazzaro *et al.* 2003). Chez *Nicotiana tabacum*, les tubes polliniques soumis à des augmentations des pressions osmotiques montrent un renflement au niveau apical (Zonia *et al.* 2004).

Un autre paramètre important pour la croissance apicale est sa direction. Pour maintenir la direction de croissance, la cellulose et le réseau cellulose/xyloglucanes doivent être fonctionnels. L'application de la cellulase provoque un changement dans la direction de croissance. Il peut s'agir d'un arrêt temporaire de la croissance causé par une modification partielle de la composition chimique de la paroi apicale. L'élasticité de la paroi des tubes polliniques dépend du degré d'estérification des pectines (Parre et Geitmann 2005b). Le changement de la composition chimique affecte directement les propriétés physiques de la paroi. Cette dernière est moins propice à la croissance à certains endroits. Par la suite, la reprise de la croissance a lieu là où les propriétés physiques de la paroi permettent son extension sous l'effet de la pression osmotique (Fig.2). Ce même phénomène est observé lors de l'élimination du fucose ce qui pourrait perturber la formation du réseau cellulose/hémicelluloses et par conséquent un mauvais agencement des composants de la paroi.

La nouvelle excroissance des tubes traités avec la cellulase semble par la suite maintenir une direction de croissance linéaire. Le diamètre ainsi que la croissance des nouvelles excroissances sont stabilisés par le rajout de suppléments pectiques pariétaux. Par contre,

les tubes auxquels manque le fucose ne maintiennent pas une croissance linéaire ni un diamètre fixe. Ceci suggère que la cellulose et le réseau cellulose/xyloglucanes jouent un rôle crucial dans la résistance au stress de tension dans la zone subapicale des tubes polliniques.

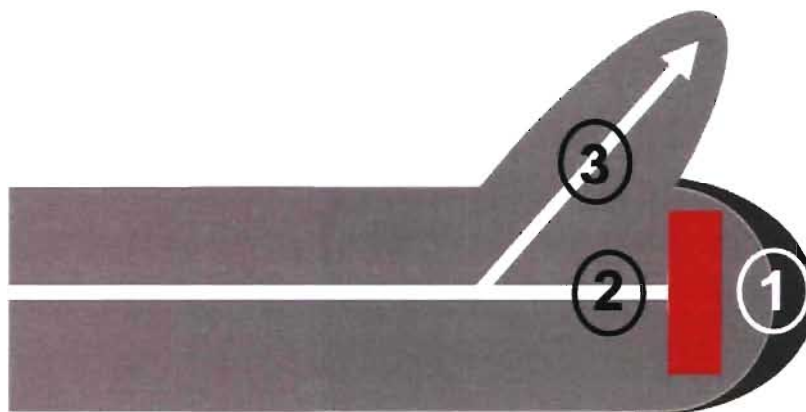


Fig.2. Les étapes proposées dans les tubes traités avec la cellulase. La première étape consiste en un changement de la composition chimique de la zone apicale. L'étape 2 survient suite à ce changement et se résume en un arrêt temporaire de la croissance, imposée par le manque d'élasticité de la paroi apicale. La troisième étape marque la reprise de la croissance toujours soutenue par la pression interne (flèche blanche) et le relâchement de la paroi subapicale suite à la digestion de la cellulose.

L'inhibition de la synthèse de la cellulose sous sa forme cristalline a des conséquences dramatiques sur la croissance en général. L'inhibiteur cause l'arrêt de la croissance ainsi que la modification de la composition chimique du dôme apical. L'inhibiteur cause une désorganisation du système de synthèse de la cellulose. Ceci favorise la production de la cellulose sous sa forme amorphe du fait du mauvais alignement des microfibrilles (Peng *et al.* 2001). Ce changement dans le degré de cristallinité affecte la mécanique de la paroi cellulaire parce que l'alignement parallèle des microfibrilles renforcerait la paroi de façon anisotrope ce qui pourrait guider les autres composants de la paroi à se greffer autour du cadre formé par la cellulose (Cosgrove 1997).



La caractéristique essentielle des configurations pariétales dans le cas du pollen est qu'elles permettent une croissance tenant compte de la diversité tant au niveau des messages chimiques qu'au niveau des disparités anatomiques florales.

De plus, la paroi est capable de s'adapter aux changements dus aux traitements chimiques qui modifient profondément son réseau de polymères. Sur un long terme et en pleine croissance apicale, la synthèse et l'intégration appropriées des polymères pariétaux nouvellement synthétisés en zone distale sont indispensables au maintien de l'intégrité de la paroi et par conséquent au succès de la croissance exclusive au dôme apical.

## 4.1 Perspectives futures

### 4.1.1 Emploi de mutants pariétaux

La plante modèle pour la recherche génétique du monde végétal expérimental est *Arabidopsis thaliana*. La totalité du génome d'*Arabidopsis* a été séquencé. En plus de comporter une panoplie de mutants largement identifiés, différentes bases de données ouvrent l'accès au génome séquencé, au métabolisme ainsi qu'au stock d'ADN. L'utilisation de mutants et de doubles mutants de la paroi permettrait de définir son rôle de façon plus précise en comparaison avec l'emploi d'enzymes pouvant affecter d'autres aspects de la croissance en général.

L'étude de la croissance apicale dans des espèces mutantes de la paroi est une alternative aux différents traitements chimiques de la paroi des tubes. L'investigation de la famille des CesA impliqués dans la synthèse de la cellulose chez les tubes polliniques. L'étude de la croissance des tubes de mutants de la paroi permettra de cerner de façon plus concise l'implication des composants polysaccharidiques dans le processus de croissance. Cependant, le risque d'une approche avec les mutants est l'effet potentiel létal sur le pollen. De même, le fait d'obtenir un mutant knock-out d'un gène quelconque ne serait peut-être pas suffisant pour l'étude de l'expression de ce gène. L'effet de redondance causé par d'autres produits de gènes (homologues ou pas) pourrait masquer le phénotype mutant attendu.

Ainsi, il se pourrait que certaines protéines/enzymes aient des fonctions proches de la fonction initiale de la protéine découlant du gène muté. L'étude de la distribution des composants pariétaux dans des plantes mutantes ainsi que leur connection aux performances mécaniques des tubes polliniques permettrait d'obtenir de nouvelles connaissances sur le rôle de chacun de ces composants.

#### **4.1.2 Optimisation de l'immunomarquage pariétal**

L'amélioration des conditions de marquage de certains composants de la paroi pourrait augmenter la qualité de la fluorescence. Dans le cas de la cellulose, la digestion modérée de la matrice cellulaire ne peut qu'être bénéfique. En effet les microfibrilles de cellulose baignent dans la matrice composée de pectines et d'hémicelluloses. L'accessibilité des composants cellulosiques influence directement la qualité des marquages en microscopie à fluorescence. De plus, l'alternance de zones amorphes dans une microfibrille cristalline laisse penser à un marquage faisant la distinction entre ses deux états. De tels anticorps sont développés mais toujours au stade expérimental au sein du laboratoire du Dr Paul Knox à l'University of Leeds.

#### **4.1.3 Emploi de la microscopie confocale**

Dans le but d'une évaluation plus précise des proportions de cellulose dans la paroi des tubes plusieurs stratégies peuvent être adoptées. L'utilisation de la microscopie confocale pourrait apporter des améliorations à la visualisation des marquages en fluorescence de la cellulose.

Avec la microscopie à fluorescence conventionnelle (employée ici), les images subissent une perte de résolution due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet, la microscopie confocale pallie ces inconvénients en réalisant des coupes optiques virtuelles dans le spécimen et en enregistrant l'image de la fluorescence émise dans le plan focal uniquement. L'optimisation du marquage et l'emploi de la microscopie confocale permettraient de mieux localiser les divers composants pariétaux et de les intégrer dans le modèle en cours de construction afin de mieux comprendre la croissance apicale des tubes polliniques.

#### **4.1.4. Caractérisation et localisation de la machine de synthèse de la cellulose**

La localisation des cellulose synthases permettrait de mieux cerner la synthèse de la cellulose dans la paroi des tubes polliniques. Des anticorps de marquage des CESA sont disponibles. Le marquage en fluorescence pourrait se combiner à la visualisation de la disposition des rosettes dans la membrane plasmique des tubes polliniques de diverses espèces. La microscopie électronique à transmission et la deep-freeze fracture permettent la visualisation des CESA et de définir un pattern de distribution au niveau de la membrane plasmique des tubes polliniques.

## 4.2 Bibliographie

- Adams, D. J. (2004). "Fungal cell wall chitinases and glucanases." Microbiology **150**(7): 2029-2035.
- Anderson, J. R., W. S. Barnes and P. Bedinger (2002). "2,6-dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes." Journal of Plant Physiology **159**(1): 61-67.
- Bartnicki-Garcia, S., F. Hergert and G. Gierz (1989). "Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth." Protoplasma **153**: 46-57.
- Baskin, T. I. (2005). "Anisotropic expansion of the plant cell wall." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**: 203-222.
- Bibikova, T. N., A. Zhigilei and S. Gilroy (1997). "Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity." Planta **203**(4): 495-505.
- Burton, R. A., D. M. Gibeaut, A. Bacic, K. Findlay, K. Roberts, A. Hamilton, D. C. Baulcombe and G. B. Fincher (2000). "Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene." Plant Cell **12**(5): 691-705.
- Castle, E. S. (1955). "The mode of growth of epidermal cells of the *Avena* coleoptile." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **41**: 197-199.
- Castle, E. S. (1958). "The topography of tip growth in a plant cell." Journal of General Physiology **41**: 931-926.
- Chen, J. C. W. (1973). "The kinetics of tip growth in the *Nitella* rhizoid." Plant Cell Physiology **14**: 631-640.
- Cosgrove, D. (1986). "Biophysical control of plant-cell growth." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **37**: 377-405.

- Cosgrove, D. J. (1997). "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants." Annual Review of Cell and Developmental Biology **13**: 171-201.
- Cosgrove, D. J. (2000). "Expansive growth of plant cell walls." Plant Physiology **38**(1-2): 109-124.
- Dumais, J., S. R. Long and S. L. Shaw (2004). "The mechanics of surface expansion anisotropy in *Medicago truncatula* root hairs." Plant Physiology **136**(2): 3266-3275.
- Dumais, J., S. L. Shaw, C. R. Steele, S. R. Long and P. M. Ray (2006). "An anisotropic-viscoplastic model of plant cell morphogenesis by tip growth." International Journal of Developmental Biology **50**(2-3): 209-222.
- Emons, A. M. C. and A. M. C. Wolters-Arts (1983). "Cortical microtubules and microfibril deposition in the cell-wall of root hairs of *Equisetum hyemale*." Protoplasma **117**(1): 68-81.
- Geitmann, A. and M. Steer (2006). "The architecture and properties of the pollen tube cell wall." Plant Cell Monographs **3**: 177-200.
- Green, P. B. (1963). "Cell walls and the geometry of plant growth." In Meristems and Differentiation. Brookhaven Symposia in Biology **16**: 203-217.
- Haberlandt, G. (1887). "Über die Beziehungen zwischen Function und Lage des Zellkernes bei den Pflanzen." Fischer, Jena.
- Heath, I. B. (1990). "Tip growth in plant and fungal cells." ed. Academic Press, San Diego.
- His, I., A. Driouich, F. Nicol, A. Jauneau and H. Höfte (2001). "Altered pectin composition in primary cell walls of *korrigan*, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase." Planta **212**(3): 348-358.
- Lazzaro, M. D., J. M. Donohue and F. M. Soodavar (2003). "Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes." Protoplasma **220**(3 - 4): 201.
- Majewska-Sawka, A., M. C. Fernández, M. M'rani-Alaoui, A. Münster and M. I. Rodríguez-García (2002). "Cell wall reformation by pollen tube protoplasts of olive

- (*Olea europaea* L.): structural comparison with the pollen tube wall." Sexual Plant Reproduction **15**(1): 21.
- Miller, D. D., D. A. Callaham, D. J. Gross and P. K. Hepler (1992). "Free  $\text{Ca}^{+2}$  gradient in growing pollen tubes of *Lilium*." Journal of Cell Science **101**: 7-12.
- Money, N. P. (1997). "Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth." Fungal Genetics and Biology **21**(2): 173-187.
- Parre, E. and A. Geitmann (2005a). "More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes." Plant Physiology **137**(1): 274-286.
- Parre, E. and A. Geitmann (2005b). "Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*." Planta **220**(4): 582-592.
- Peng, L., F. Xiang, E. Roberts, Y. Kawagoe, L. C. Greve, K. Kreuz and D. P. Delmer (2001). "The experimental herbicide CGA 325'615 inhibits synthesis of crystalline cellulose and causes accumulation of non-crystalline  $\beta$ -1,4-gucan associated with CesA protein." Plant Physiology **126**(3): 981-992.
- Popper, Z. A. and S. C. Fry (2005). "Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells." Annals of Botany **96**(1): 91-99.
- Probine, M. C. and R. D. Preston (1962). "Cell growth and the structure and mechanical properties of the wall in internodal cells of *Nitella opaca*: II. Mechanical properties of the walls." Journal of Experimental Botany **13**(1): 111-127.
- Reinhardt, M. O. (1892). "Das Wachstum der Pilzhyphen." Jahrbuch der Wissenschaften Botanik **23**: 479-566.
- Schlüpmann, H., A. Bacic and S. M. Read (1994). "Uridine-diphosphate glucose-metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana-Alata* Link et Otto." Plant Physiology **105**(2): 659-670.
- Shaw, S. L., J. Dumais and S. R. Long (2000). "Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*." Plant Physiology **124**(3): 959-70.

- Shedletzky, E., M. Shmuel, D. P. Delmer and D. T. A. Lamport (1990). "Adaptation and growth of tomato cells on the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile leads to production of unique cell-walls virtually lacking a cellulose-xyloglucan network." Plant Physiology **94**(3): 980-987.
- Shedletzky, E., M. Shmuel, T. Trainin, S. Kalman and D. Delmer (1992). "Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile : A comparison between two dicotyledonous plants and a graminaceous monocot." Plant Physiology **100**(1): 120-130.
- Somerville, C. (2006). "Cellulose synthesis in higher plants." Annual Review of Cell and Developmental Biology **22**(1).
- Taiz, L. (1984). "Plant cell expansion - Regulation of cell wall mechanical properties." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **35**: 585-657.
- Whitney, S. E. C., M. G. E. Gothard, J. T. Mitchell and M. J. Gidley (1999). "Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls." Plant Physiology **121**(2): 657-664.
- Zonia, L. and T. Munnik (2004). "Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes." Plant Physiology **134**(2): 813-823.